

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS

DIANA TREML

**Desenvolvimento de método para detecção e quantificação evento-
específico do feijoeiro Embrapa 5.1 por PCR em tempo real (qPCR)**

FLORIANÓPOLIS
2015

DIANA TREML

Desenvolvimento de método para detecção e quantificação evento-específico do feijoeiro Embrapa 5.1 por PCR em tempo real (qPCR)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^ª Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi

FLORIANÓPOLIS
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Treml, Diana

Desenvolvimento de método para detecção e quantificação
evento-específico do feijoeiro Embrapa 5.1 por PCR em tempo
real (qPCR) / Diana Treml ; orientadora, Ana Carolina
Maisonnave Arisi - Florianópolis, SC, 2015.
95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Feijão Embrapa 5.1. 3.
OGM. 4. qPCR. I. Arisi, Ana Carolina Maisonnave. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me dar saúde e força para atingir meus objetivos.

Agradeço aos meus pais, Cassio e Roseli, por me apoiarem, incentivarem a ajudarem a chegar até aqui: vocês são tudo para mim.

À professora Dra. Ana Carolina Arisi, que me recebeu em seu laboratório e confiou no meu trabalho. Agradeço pela excelente orientação e suporte.

Aos meus irmãos, Àgata e Eduardo, que me aguentam no dia a dia, suportando o mau humor, o estresse. Principalmente minha irmã Àgata, que esteve comigo nesses dois anos.

Ao meu namorado Iuri, que esteve comigo nos momentos finais, sempre me incentivando e apoiando: obrigada por todo o carinho.

Aos colegas de laboratório, uma equipe maravilhosa, que não mede esforços para ajudar e que me acolheu prontamente.

À Mirella Scariot que se tornou uma grande amiga.

A Embrapa, pelo fornecimento das amostras e das informações para realização deste trabalho, especialmente ao Dr. Josias de Corrêa Faria.

Ao conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos, que possibilitou a realização desta dissertação.

Ao programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos e a Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade.

Enfim, a todos aqueles que estiveram comigo nesses dois anos: obrigada.

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existe são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles”

Augusto Cury

Treml, Diana. Desenvolvimento de método para detecção e quantificação evento-específico do feijoeiro Embrapa 5.1 por PCR em tempo real (qPCR). 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

RESUMO

Entre os métodos de quantificação de OGM para rotulagem de alimentos, o método que utiliza reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) evento-específico é o mais adequado. O evento feijoeiro GM Embrapa 5.1 foi aprovado para comercialização no Brasil em 2011, tornando necessário a sua rotulagem em alimentos. Nesse trabalho foi desenvolvido um método qPCR evento-específica para detecção de feijão GM Embrapa 5.1, pelo desenho de um par de iniciadores e uma sonda para a região de junção do DNA do feijão com o DNA recombinante. O método foi validado utilizando-se dois protocolos para a extração do DNA da folha do feijão: CTAB e DNeasy Plant Mini kit. A especificidade dos iniciadores na qPCR foi avaliada utilizando a metodologia SYBR Green. Os iniciadores apresentaram maior especificidade quando a quantidade final de iniciadores na reação de qPCR foi de 300 nM, com elevada especificidade. A sonda TaqMan foi desenvolvida para aumentar a especificidade, com melhores resultados obtidos utilizando-se uma quantidade final de sonda de 250 nM. Os ensaios de repetibilidade, através da amplificação das amostras compondo uma diluição seriada, apresentaram eficiências entre 85 e 103% para amostras de feijão GM Embrapa 5.1 das variedades Pérola e Pontal extraídas com DNeasy Plant mini kit e de 89 e 85% para as mesmas amostras extraídas pelo método CTAB. O limite de detecção do ensaio foi de 10^2 cópias de DNA quando o DNA de feijão GM foi diluído em DNA de feijão não GM, utilizando a metodologia TaqMan. A eficiência média da qPCR com amostras de semente de feijão Pérola GM Embrapa 5.1 extraídas com DNeasy Plant Mini kit, foi de 100%. O método de qPCR desenvolvido nesse trabalho apresenta parâmetros adequados quanto a especificidade, eficiência, linearidade e limite de detecção para a identificação e quantificação do evento feijão GM Embrapa 5.1.

Palavras- chave: qPCR, feijão, OGM, detecção, quantificação, SYBR Green, TaqMan

ABSTRACT

Among the methods for GMO quantification for food labeling, the method that uses quantitative event-specific polymerase chain reaction (qPCR) is the most suitable. The event GM common bean Embrapa 5.1 was approved for commercialization in Brazil, in 2011. So, it is necessary to label it in foods. In this work it was developed an event-specific qPCR method to detect GM common bean Embrapa 5.1, through the design of a primer pair and a probe that target the region of junction of common bean DNA with the recombinant DNA. The method was validated using two protocols to DNA extraction from common bean leaves: CTAB and DNeasy plant mini kit. The specificity of the primer pair was assessed using SYBR Green. The primers showed higher specificity when the final quantity of primer was 300 nM. One TaqMan probe was developed to increase the specificity with best results achieved when the probe concentration was 250 nM. The repeatability assay, through the amplification of samples serially diluted in water, showed efficiencies between 85 and 103% for varieties of Pérola and Pontal GM common bean Embrapa 5.1 extracted with DNeasy Plant mini kit and of 89 and 85% for the same samples extracted with CTAB. The limit of detection of the assay was 10^2 copies when DNA of GM common bean was diluted in DNA of non-GM common bean using a TaqMan probe. The mean efficiency of qPCR with samples of grain of GM Pérola 5.1 extracted with DNeasy Plant mini kit was of 100%. The qPCR method developed in this work showed suitable parameters regarding to specificity, efficiency, linearity and limit of detection for the identification and quantification of the event Embrapa 5.1.

Key-words: qPCR, Embrapa GM 5.1 common bean, detection, quantification, SYBR Green, TaqMan

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1.1: representação dos elementos genéticos utilizados na transformação de uma planta para expressão de um gene de interesse .	29
Figura 1.2: mapa do fragmento inserido no feijão GM Embrapa 5.1....	32
Figura 1.3: esquema representativo dos alvos de detecção de OGMs...	36
Figura 1.4: modo de ação do corante intercalante de DNA SYBR Green	39
Figura 1.5: qPCR utilizando a sonda linear de hidrólise TaqMan	40
Figura 1.6: curva de amplificação (ΔR_n versus ciclo) apresentando as fases da PCR em tempo real, o threshold e o Ct.	41

CAPÍTULO 2

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1: trabalhos que desenvolveram ensaios evento específicos para a detecção e quantificação de OGMs.....	49
---	----

CAPÍTULO 2

LISTA DE ABREVIATURAS

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento
Ct – ciclo threshold
CTAB – brometo de cetil-trimetilamônio.
CTNBIO – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DNA – ácido desoxirribonucleico
EDTA – ácido etilenodiamino tetracético
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FEI – sonda para referência endógena
FGM – sonda evento-específica
GM – geneticamente modificado
LOD – limite de detecção
MGB – minor groove binding
OGM – organismo geneticamente modificado
OLA – sonda construção-específica
PCR – reação em cadeia de polimerase
qPCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA – ácido ribonucleico
Threshold – limiar de detecção
Tm – temperatura de *melting*
VMDF – vírus do mosaico dourado do feijoeiro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	21
CAPÍTULO 1.....	25
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
1.1 FEIJÃO.....	25
1.2 VÍRUS DO MOSAICO DOURADO DE FEIJOEIRO (VMDF)..	27
1.3 ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS (OGMs)28	
1.3.1Feijão Embrapa 5.1.....	31
1.4 LEGISLAÇÃO PARA ROTULAGEM DE OGM EM ALIMENTOS.....	32
1.5 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR).....	33
1.6 PCR EM TEMPO REAL (qPCR)	37
1.7 EXTRAÇÃO DE DNA	42
1.8 CRITÉRIOS DE PERFORMANCE PARA A qPCR.....	45
1.9 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO EVENTO-ESPECÍFICA DE OGMS	46
1.10 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FEIJÃO GM EMBRAPA 5.1.....	51
CAPÍTULO 2.....	53
2 DEVELOPMENT OF AN EVENT-SPECIFIC HYDROLYSIS PROBE QUANTITATIVE REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY FOR EMBRAPA 5.1 GENETICALLY MODIFIED COMMON BEAN (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICE A - Border Junction Sequence of Embrapa 5.1 Event Showing Amplified Fragment Using BeanF/ VectorR R Primer Pair and FGM Probe.....	91
APÊNDICE B - Specificity test of SYBR GREEN assay using different beanF/vectorR primer pair concentrations.....	93
APÊNDICE C - TaqMan FGM assay standard curves obtained in 3 qPCR runs using three DNA extracts from each GM variety. Each PCR run were performed in a different day.....	95

INTRODUÇÃO

O feijão comum, *Phaseolus vulgaris*, é um alimento comum para muitos brasileiros. Informações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) indicam que 7 em cada 10 brasileiros o consomem diariamente. O grão de feijão é uma boa fonte de proteínas, oligossacarídeos, compostos fenólicos, cálcio, fósforo, potássio, vitaminas do complexo B, entre outros nutrientes.

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão (MAPA, 2014), mas essa cultura é afetada por muitas doenças que prejudicam sua qualidade e produtividade. Entre essas doenças, o vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF) tem destaque. Os prejuízos causados por esse vírus recaem sobre toda a América Latina, com perdas que variam de 40 a 100% das plantações (ARAGÃO e FARIA, 2009). As plantas mais jovens estão mais susceptíveis ao ataque pelo VMDF e os meses de verão são considerados mais críticos, devido à maior população da mosca responsável pela transmissão do vírus (EMBRAPA, 2005).

Devido à importância da cultura do feijão no Brasil e às perdas causadas pelo VMDF, pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) trabalham, desde os anos 90, no desenvolvimento de um feijão geneticamente modificado (GM) que apresente resistência a esse vírus. O resultado de anos de pesquisa foi o desenvolvimento do feijão GM Embrapa 5.1. Esse feijão é um marco para a pesquisa brasileira por se tratar do primeiro organismo geneticamente modificado totalmente produzido por uma empresa pública brasileira e com liberação comercial aprovada..

O feijão Embrapa 5.1 foi aprovado para comercialização no Brasil em 2011, pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), após um rigorosa avaliação da sua biossegurança. Além do feijoeiro GM Embrapa 5.1, foram produzidas diversas linhagens GM, entre elas, o feijoeiro GM Embrapa 2.3, que também apresentou resistência ao vírus, mas que não foi submetido à avaliação agrônômica, nem de biossegurança e, portanto, é um evento GM que não foi autorizado comercialmente (ARAGÃO e FARIA, 2009).

De acordo com James (2014) o Brasil é o segundo maior produtor de culturas biotecnológicas, precedido apenas pelos EUA. Atualmente são liberados no país a comercialização de 37 variedades de OGMs (CTNBIO, 2014). Desde o surgimento do tomate FlavSavr nos EUA, em 1994, que foi a primeira planta GM disponível para comercialização (GREINER; KONIETZNY; VILLAVICENCIO, 2005), os debates com relação ao direito de escolha dos consumidores ganharam destaque.

Com o objetivo de permitir que o consumidor possa optar pelo consumo ou não de OGMs, a legislação brasileira, através do decreto 4.680 (BRASIL, 2003), estabelece a rotulagem obrigatória quando a quantidade de OGM for superior a 1% do produto final.

A partir do momento que um novo OGM entra no mercado, surge a necessidade legal de uma metodologia que seja capaz de detectar e quantificar sua presença nos alimentos, afim de atender a legislação vigente. Os OGMs apresentam um (ou mais) novo (s) gene (s), que lhes conferem as características de interesse. Os métodos de análise de OGMs baseiam-se na identificação desses genes ou das proteínas por eles codificadas (HERNANDEZ; RODRIGUEZ-LAZARO; FERRANDO, 2005; MIRAGLIA et al., 2004).

Os métodos baseados na presença de DNA são preferíveis aos métodos baseados em proteínas, já que permitem uma análise quantitativa mais precisa, além da possibilidade de análise de produtos altamente processados, nos quais as proteínas acabam sendo degradadas (HERNANDEZ et al., 2005). Os métodos de análise de OGMs baseados no DNA normalmente empregam a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), por sua elevada especificidade, sensibilidade e rapidez (BAEUMLER et al., 2006; HURST; KNIGHT; BRUCE, 1999). A PCR convencional não permite a quantificação do OGMs. Para garantir o atendimento à legislação, é necessário empregar a PCR em tempo real (qPCR), que segue o mesmo princípio da PCR convencional, mas permite monitorar a reação de amplificação do DNA molde nas fases iniciais da amplificação e quantificar a presença de OGM em alimentos.

Entre os métodos de detecção e quantificação de OGMs, o método evento-específico é o que apresenta maior especificidade, já que o alvo da PCR é a região de junção do DNA da planta com o DNA recombinante. Para cada evento GM essa região é única, portanto esse método permite distinguir eventos autorizados para comercialização daqueles que não o são.

Desde 2009, trabalhos foram desenvolvidos para a detecção e quantificação do feijão Embrapa 5.1. Dinon et al. (2012) desenvolveu iniciadores e sondas para uma referência endógena do feijão e para um fragmento construção-específica do feijão Embrapa 5.1. Brod et al. (2013) produziu um plasmídeo calibrante contendo um fragmento de referência endógena e um fragmento construção específica do feijão Embrapa 5.1 para ser utilizada como material de referência para a quantificação desse evento. Venturelli et al. (2014) estabeleceu uma nova referência endógena para o feijão, tendo como alvo o gene

codificador da lectina do feijão, gene que apresenta maior homogeneidade entre diferentes variedades da leguminosa.

Apesar de todos os trabalhos já publicados, até momento não tinha sido desenvolvido nenhum método evento-específico para a detecção e quantificação do feijão GM Embrapa 5.1. Como existem diversos eventos GM com o mesmo DNA recombinante, mas apenas um deles foi liberado para comercialização no Brasil, um método evento-específico, capaz de diferenciar eventos autorizados daqueles ainda não autorizados, se faz necessário.

Este trabalho está apresentado em dois capítulos. O primeiro capítulo é composto pela revisão bibliográfica, que aborda 11 tópicos: feijão, vírus do mosaico dourado do feijoeiro, feijão Embrapa 5.1, organismos geneticamente modificados, legislação para rotulagem de OGMs, reação em cadeia de polimerase (PCR), PCR em tempo real, extração de DNA, critérios de performance para a qPCR, detecção e quantificação evento-específica de OGMs e detecção e quantificação de feijão GM 5.1. O segundo capítulo é apresentado na forma de artigo científico e apresenta os resultados do desenvolvimento de um ensaio evento-específico por qPCR para a quantificação do feijão Embrapa 5.1. Para a realização do trabalho foram desenvolvidos iniciadores e uma sonda para a região de junção do DNA do feijão com o DNA recombinante que foi empregado para a transformação desse feijão. Os ensaios foram realizados com o corante intercalante SYBR Green e com a sonda linear de hidrólise TaqMan e o evento GM Embrapa 2.3 foi utilizado como principal controle negativo.

CAPÍTULO 1

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesse tópico serão abordados os seguintes temas: feijão, vírus do mosaico dourado do feijoeiro, feijão Embrapa 5.1, organismos geneticamente modificados, legislação para rotulagem de OGMs em alimentos, reação em cadeia de polimerase (PCR), PCR em empo real, extração de DNA, critérios de performance para qPCR, detecção e quantificação evento-específica de OGMs, detecção e quantificação de feijão GM Embrapa 5.1.

1.1 FEIJÃO

De acordo com a legislação brasileira, feijão é grão proveniente das espécies *Phaseolus vulgaris* L. e *Vigna unguiculata* (L) Walp. O feijão pertencente à espécie *Phaseolus vulgaris* L. corresponde ao feijão comum; já o feijão pertencente à espécie *Vigna unguiculata* (L) corresponde ao feijão-Caupi, feijão-de-corda ou feijão-Macassar. (BRASIL, 2008).

Segundo a classificação botânica do feijoeiro comum, essa planta pertence à ordem Rosales, à família Fabaceae, à sub-família Faboideae, à tribo Phaseolaeae, ao gênero *Phaseolus* e à espécie *Phaseolus vulgaris* (VILHORDO et al., 1996).

O feijão é originário do continente americano e, após o descobrimento da América, foi cultivado no Velho Mundo como uma planta ornamental (ZIMMERMANN e TEIXEIRA, 1996). O gênero *Phaseolus* é composto por 30 espécies, mas apenas 5 foram domesticadas. Entre essas cinco espécies, o feijão comum, ou *Phaseolus vulgaris*, é a espécie mais cultivada (SINGH, 2001).

Para a população brasileira, o feijão é um dos principais componentes alimentícios por se tratar de uma boa fonte de proteínas (DE FARIA et al., 2013), que apresentam elevada qualidade e baixo custo (SVETLEVA; VELCHEVA; BHOWMIK, 2003).

Além do Brasil, o feijão é utilizado como fonte de proteínas em inúmeros países ao redor do mundo (DEVI et al., 2013; MERCATI et al., 2013), sendo cultivado principalmente no sul da África e na América Latina. Na Europa, apenas 1% do território é utilizado para a produção do feijão (MERCATI et al., 2013).

Além do elevado teor de proteína, esse grão também apresenta elevado conteúdo de lisina que complementa as proteínas presentes nos

cereais (LAJOLO; GENOVESE; MENEZES, 1996). Devido ao baixo custo das proteínas presentes em sua composição, o feijão pode ser utilizado para substituir as proteínas de origem animal. Os feijões são ricos em aminoácidos essenciais, mas são carentes em metionina e triptofano. Além disso, os feijões são uma boa fonte de fibras solúveis e insolúveis. As fibras solúveis auxiliam na redução do colesterol e da quantidade de açúcar no sangue. As fibras insolúveis auxiliam no bom funcionamento gastrointestinal. O feijão ainda é uma boa fonte de cálcio, cobre, ferro, magnésio, fósforo, potássio e zinco. Devido à sua digestão lenta, os feijões produzem um baixo índice glicêmico e resposta à insulina (ANDERSON; SMITH; WASHNOCK, 1999). O grão também é rico em carboidratos e vitaminas do complexo B (LAJOLO; GENOVESE; MENEZES, 1996).

O consumo de feijão está relacionado com a redução do risco de diabetes e de obesidade e na redução de doenças coronárias. Os fitoquímicos presentes no feijão são responsáveis pelos efeitos fisiológicos do consumo de feijão. Esses fitoquímicos apresentam propriedades anticarcinogênicas e antioxidantes (CARDADOR-MARTINEZ; LOARCA-PINA; OOMAH, 2002).

Essa leguminosa pode ser cultivada em quase todos os estados brasileiros, durante o ano todo. O feijão comum, *Phaseolus vulgaris*, é cultivado em todo o território. Já o feijão de corda, macassar ou caupi (*Vigna unguiculata*), é predominante no Nordeste e região Amazônica. Além do Brasil, o feijão caupi é cultivado na África, Ásia e em outros países da América do Sul, tendo grande importância nas regiões subtropicais e tropicais do mundo (PARANÁ, 2013).

O feijoeiro apresenta uma grande variabilidade de cor, tamanho e forma da semente e a popularidade dos grãos varia nas diferentes regiões do Brasil. Nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, sul e leste do Paraná, Rio de Janeiro, sudeste de Minas Gerais e sul do Espírito Santo o consumo do feijão preto é mais comum. O feijão carioca é bem aceito em todos os estados, enquanto o feijão mulatinho é mais comum na região Nordeste. No estado de Goiás e em algumas regiões de Minas Gerais é comum o consumo do feijão roxo, na região Norte são comuns os feijões rosinha e jalo e na zona da mata de Minas Gerais consome-se o feijão vermelho (MAPA; ZIMMERMANN e TEIXEIRA, 1996).

O feijoeiro comum ou *Phaseolus vulgaris* não se adapta bem aos trópicos úmidos e cresce bem em locais com chuvas regulares. Essa espécie é sensível à geadas e temperaturas elevadas (ZIMMERMANN e TEIXEIRA, 1996). Em locais com temperatura diurna superior a 30°C e

noturna inferior à 20°C, em planícies e altas latitudes pode ocorrer limitação da sua produção (SINGH, 2001).

Segundo informações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2014), o plantio de feijão no Brasil é realizado em três safras. A primeira é a safra das águas, na qual o plantio e a colheita ocorrem em épocas com alto índice de chuvas. Essa primeira safra compreende os meses de agosto a dezembro na região Centro-Sul e entre os meses de outubro a fevereiro no Nordeste. A segunda safra é a safra da seca e é realizada entre dezembro e março, num período de maiores secas. Já a terceira safra corresponde aos meses de abril a junho e que corresponde ao feijão irrigado. Após o plantio, o feijão pode ser colhido em 90 dias.

Os dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2014) com relação à produção de feijão mostram que na safra de 2013/2014 foram produzidos 3,44 milhões de toneladas de grãos. A estimativa para a safra 2014/2015 é de uma produção entre 3,15 e 3,20 milhões de toneladas. A região Sul apresentou a maior produção de grãos de feijão em 2013/2014, com 1,03 milhões de toneladas, com destaque para o estado do Paraná. Para a safra 2014/2015 estima-se que a maior produção também ocorra nos estados do Sul do país, novamente com maior produção no Paraná. Estima-se que sejam produzidos entre 0,91 e 0,93 milhões de toneladas (BRASIL, 2014).

O cultivo do feijão pode ter seu rendimento afetado por várias espécies associadas à cultura. As perdas podem chegar a 100%, dependendo da cultivar, do estágio de desenvolvimento da planta e da época de plantio. A mosca branca é uma das pragas responsáveis pelas maiores perdas de produção, principalmente pela transmissão do vírus do Mosaico Dourado do Feijoeiro (VMDF) (FARIA e YOKOYAMA, 2008).

1.2 VÍRUS DO MOSAICO DOURADO DE FEIJOEIRO (VMDF)

O vírus do mosaico dourado do feijoeiro (VMDF) é transmitido pela mosca branca *Bemisia tabaci*. Esse vírus pertence ao gênero *Begomovirus*, que é caracterizado por duas moléculas de DNA de fita simples (DNA-A e DNA-B). No DNA-A estão os genes que codificam as proteínas que são responsáveis pela replicação viral. A doença é caracterizada pela coloração amarela das folhas, crescimento atrofiado e vagens destorcidas (ARAGÃO e FARIA, 2009; BONFIM et al., 2007). Os sintomas surgem primeiro nas folhas mais novas para depois atingir toda a planta. Pode ocorrer o enrolamento das folhas mais jovens, ou

elas podem apresentar rugosidade, com pouca redução de tamanho. Quando as plantas são infectadas com até 20 dias de idade, podem apresentar redução de porte, sementes descoloridas, vagens deformadas e redução do peso (QUINTELA, 2002).

Esse vírus não ataca apenas o feijão (*Phaseolus vulgaris*), mas também importantes espécies cultivadas: tomate (*Solanum lycopersicum*), milho (*Zea mays*), mandioca (*Manihot esculenta*) e algodão (*Gossypium hirsutum*) (ARAGÃO e FARIA, 2009).

O vírus traz grandes prejuízos na produção de feijão na América Latina, sendo responsável por perdas de 40 a 100%. No Brasil, as perdas na produção de feijão causadas por esse vírus ocorrem desde 1972 (ARAGÃO e FARIA, 2009).

A mosca branca está presente na grande maioria dos locais produtores de feijão. Existem estimativas de que na América Latina, as perdas causadas por essa praga atinjam 1 milhão de hectares plantados com feijão. As maiores perdas ocorrem nos meses de verão, já que a população de mosca é bastante elevada nessa época. Os maiores danos ocorrem quando as plantas são afetadas no início do seu desenvolvimento (EMBRAPA, 2005).

A primeira medida para o controle do vírus nas plantações é o uso de inseticidas, para controle do vetor. No entanto, essa medida provoca a seleção de insetos resistentes ao inseticida, além de apresentar alto custo para baixo benefício e dos riscos ambientais gerados pelo uso dos inseticidas (ARAGÃO e FARIA, 2009; BONFIM et al., 2007). Além disso, essa praga apresenta uma série de hospedeiros, se adapta a condições adversas e é difícil fazer com que o agrotóxico atinja o interior da folha (LACERDA e CARVALHO, 2008).

1.3 ORGANISMOS GENETICAMENTE MODIFICADOS (OGMS)

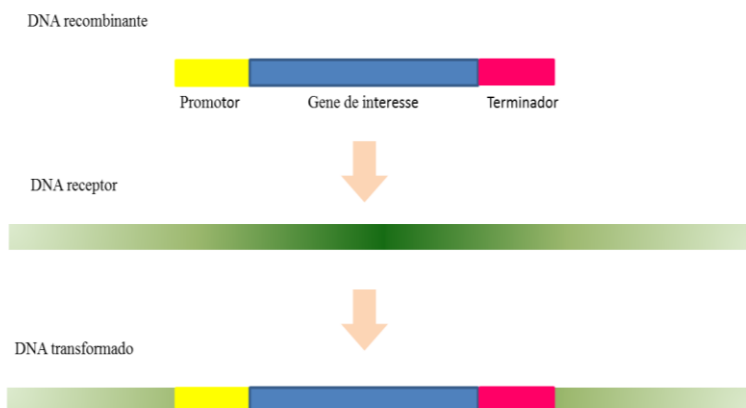
A legislação brasileira, pela lei nº 11.105 de 24 de março de 2005 (BRASIL, 2005), estabelece que organismo geneticamente modificado é todo organismo que teve seu material genético alterado por técnicas de engenharia genética.

De acordo com Fisk e Dandekar (1993), a maioria das plantas geneticamente modificadas foram obtidas utilizando o método de transformação mediado pelo *Agrobacterium* ou a incorporação do DNA pelas técnicas de bombardeamento de partículas, eletroporação e permeabilização com polietileno glicol.

A transformação de uma planta pode promover a perda ou substituição de parte do genoma de um organismo, como também inserir

um novo gene a esse genoma. Para ocorrer a expressão do gene inserido no organismo é necessário pelo menos 3 elementos: o gene de interesse; um promotor, que será responsável pelo sinal inicial para a transcrição do gene e um terminador, que será responsável pela sinalização do término da transcrição (figura 1.1) (AHMED, 2003; HOLST-JENSEN et al., 2003; MIRAGLIA et al., 2004). Outros elementos podem ser adicionados para controlar ou estabilizar a função do novo gene. Esse gene construído deve se integrar ao genoma e se perpetuar nas próximas gerações (MIRAGLIA et al., 2004).

Figura 1.1: representação dos elementos genéticos utilizados na transformação de uma planta para expressão de um gene de interesse



Fonte: adaptado de HOLST-JENSEN; DE LOOSE e VAN DEN EEDE (2006)

Dependendo da origem dos genes que foram inseridos no OGM, ele pode ser chamado de cisgênico, intragênico ou transgênico. O cisgênico e o intragênico ocorrem quando o DNA adicionado é proveniente da mesma espécie ou de outra espécie com a qual pode ocorrer troca de genes naturalmente. No cisgênico os elementos adicionados não sofrem rearranjo. No intragênico os elementos são rearranjados. No caso do transgênico, o DNA inserido é proveniente de outra espécie com a qual o receptor não trocaria genes naturalmente (HOLST-JENSEN et al., 2012).

O foco inicial da modificação genética de plantas era a alteração das características agrônômicas, conferindo resistência a inseticidas, herbicidas, vírus, doenças e retardamento do amadurecimento. Essas alterações produziram a primeira geração de plantas GM, que trouxe

benefícios para os produtores, com a redução do uso de agrotóxicos, aumento da produtividade e redução de custos. A segunda geração de plantas geneticamente modificadas corresponde àquelas plantas que foram desenvolvidas para beneficiar o consumidor, pelo aumento do valor nutricional, aumento da qualidade e redução da alergenicidade. O arroz dourado é um exemplo da segunda geração de plantas GM. Ele recebeu esse nome devido à sua coloração amarelo brilhante, devido à elevada produção de β -caroteno no endosperma (YONEKURA-SAKAKIBARA e SAITO, 2006).

Entre as plantas transgênicas produzidas mundialmente destacam-se: algodão, soja, canola, batata, morango, milho, berinjela, alface, tomate, cenoura, etc. No Havaí, 80% do mamão produzido é GM e a maior parte da canola produzida nos EUA também é GM. No caso da canola, a modificação foi feita com o objetivo de torná-la resistente ao herbicida glifosato e para melhorar sua composição. Em 2011, 32% das plantações de milho no mundo eram GM. Das plantações de beterraba para produção de açúcar nos EUA, 95% são GMs para serem resistentes a herbicidas. Essa beterraba também está aprovada em muitos outros países, como Austrália, Canadá, Japão, Nova Zelândia, entre outros (BAWA e ANILAKUMAR, 2012). A maioria dos OGMs apresentam alterações em suas características agrônômicas, principalmente para tolerância a herbicidas e resistência a insetos (HOLST-JENSEN, 2009). Além disso, a modificação genética pode conferir resistência a fungos e vírus; modificação na composição lipídica, proteica e de amido; tolerância ao estresse, entre outros (GREINER et al., 2005).

No Brasil, 37 variedades de plantas GM são liberadas para comercialização: 5 variedades de soja, 19 de milho, 12 de algodão e uma de feijão. Com exceção do feijão que é resistente ao VMDF, todas as demais plantas transgênicas liberadas no Brasil são resistentes à herbicidas ou à insetos (CTNBIO, 2014).

De acordo com James (2013), houve um aumento de 100 vezes nas áreas plantadas em 2012 com relação a 1996, passando de 1,7 para 170 milhões de hectares. China, Índia, Brasil, Argentina e África do Sul plantaram 78,2 milhões de hectares de culturas biotecnológicas, sendo responsáveis por 46% do total. O Brasil ocupou a segunda posição no ranking mundial, plantando 36,6 milhões de hectares com culturas biotecnológicas. Os dados de 2013 (JAMES, 2014) indicaram que foram plantados 175 milhões de hectares com culturas biotecnológicas. A liderança na plantação de culturas GM continua sendo dos Estados Unidos, que plantaram 70,1 milhões de hectares, que corresponde a 40% do total de área plantada. Os agricultores asiáticos, africanos e latino-

americanos plantaram 54% da área global de culturas biotecnológicas. O Brasil, em 2013, ocupou pelo quinto ano consecutivo o segundo lugar em áreas ocupadas por culturas biotecnológicas, seguido da Argentina, da Índia e do Canadá.

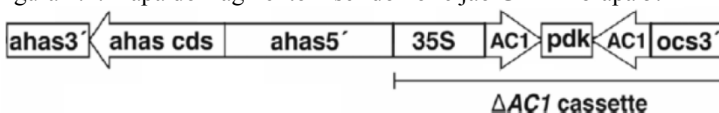
Alguns fatos tiveram destaque no ano de 2013, como a plantação de 50 mil hectares de milho GM resistente à seca, nos Estados Unidos. A tecnologia do milho resistente à seca foi doada à África, que tem a produção de milho restrita pela seca. A plantação desse milho deve iniciar em 2017. Na Indonésia foi desenvolvida e aprovada a primeira variedade de cana-de-açúcar GM resistente à seca. Além disso, o relatório de 2013 concluiu que todos os agricultores que iniciam o cultivo de culturas biotecnológicas, continuam nos anos seguintes (JAMES, 2014).

1.3.1 Feijão Embrapa 5.1

Pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) têm trabalhado desde o início dos anos 90 no desenvolvimento de um feijão GM que seja resistente ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (ARAGÃO e FARIA, 2009). O vírus ocorre na América Central, México, Caribe, Brasil e Argentina causando muitas perdas de plantações de feijão comum (SINGH, 2001). Em 2007 foi desenvolvido o primeiro feijão geneticamente modificado (GM), chamado de feijão Embrapa 5.1 e que apresenta resistência ao vírus do mosaico dourado do feijoeiro (BONFIM et al., 2007).

No feijão GM a construção recombinante inserida na planta contem duas sequencias do gene AC1, em sentidos contrários, que resulta na produção de um RNA de dupla fita desse gene. A transcrição desses genes faz com que se forme uma estrutura em forma de grampo entre as duas sequencias invertidas do gene AC1, que desencadeia um processo de degradação do RNA mensageiro e silencia a expressão do gene viral na planta. Esse fenômeno é conhecido como RNA de interferência (ARAGÃO et al., 2013; BONFIM et al., 2007). O mapa do fragmento inserido no feijão Embrapa 5.1 está representado na figura 1.2.

Figura 1.2: mapa do fragmento inserido no feijão GM Embrapa 5.1



Fonte: adaptado de Bonfim et al. (2007)

Foram obtidas 22 linhagens com a construção para o silenciamento pós-transcricional do gene AC1. As linhagens foram avaliadas em casa de vegetação e 2 linhagens, chamadas de Embrapa 2.3 e 5.1, apresentaram maior resistência após a inoculação com uma alta carga de vírus. Nos testes realizados no campo, os resultados foram confirmados. Apenas a linhagem 5.1 foi selecionada para avaliação agrônômica no campo, durante a estação de baixa incidência da doença, em diferentes regiões do Brasil. As plantas não apresentaram diferenças significativas nas características. O último estágio para a obtenção de autorização da CTNBio para a liberação comercial desse OGM foi a submissão do feijão à avaliação de biossegurança (ARAGÃO e FÁRIA, 2009). A liberação comercial do feijão Embrapa 5.1 aconteceu em 2011 (CTNBIO, 2011).

Em respeito à liberdade de escolha dos consumidores, em muitos países os governos estabeleceram legislações para a rotulagem de alimentos para presença de OGMs acima de certo limite. Nesse contexto, técnicas que permitam a quantificação de OGMs se fazem necessárias (CANKAR et al., 2006).

1.4 LEGISLAÇÃO PARA ROTULAGEM DE OGM EM ALIMENTOS

Desde que os OGMs foram liberados e introduzidos no mercado, inúmeras discussões ganharam força em relação à qualidade dos alimentos, risco ambiental, liberdade de escolha do consumidor, entre outros. Nesse contexto, regulamentações sobre a rotulagem de OGMs passaram a ser necessárias.

Na União Europeia a rotulagem de OGMs é obrigatória quando a quantidade de OGMs autorizados for superior à 0,9% (EC, 2003b). Em outros países a quantidade de OGMs para que a rotulagem seja obrigatória é superior. Na Coreia a quantidade é de 3% (KOREA, 2000) e no Japão é ainda maior, sendo de 5% (JAPAN, 2000).

No Brasil o decreto 4.680 de 24 de abril de 2003 determina que a rotulagem obrigatória de OGMs deve acontecer quando a quantidade de

OGM for superior à 1%, tanto em alimentos quanto em ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal (BRASIL, 2003).

As legislações para rotulagem de OGMs surgiram da preocupação com os riscos ambientais e de consumo. É interessante observar que um OGM pode ser liberado para uso como ração, mas pode não ser liberado para a alimentação humana (HOLST-JENSEN et al., 2012).

1.5 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)

Desde que os OGMs estão disponíveis no mercado e existem legislações a respeito da sua rotulagem, o desenvolvimento de metodologias que sejam acuradas, sensíveis e confiáveis para sua detecção e quantificação se fazem necessárias, tanto para alimentos em sua forma natural quanto para alimentos processados (AHMED, 2003; CHAOUACHI et al., 2008; FERNANDES; OLIVEIRA; MAFRA, 2013; VOLLENHOFER et al., 1999).

Os OGMs apresentam novos genes, que foram artificialmente introduzidos. Nesse sentido, os métodos para sua identificação baseiam-se na identificação desse gene ou da proteína que o mesmo codifica. As metodologias baseadas na presença da proteína buscam essa nova proteína, que é responsável pela nova característica da planta. As metodologias baseadas no DNA têm como alvo um fragmento do gene que foi inserido na planta (HERNANDEZ et al., 2005; MIRAGLIA et al., 2004).

Para a detecção e quantificação de OGMs em alimentos a maioria das metodologias baseia-se na presença de DNA. Nesse contexto, a PCR é a técnica mais popular, por ser fácil de ser realizada e pela facilidade de interpretação dos resultados (CHAOUACHI et al., 2008; DEL GAUDIO et al., 2012), além de apresentar alta sensibilidade, especificidade e ser relativamente rápida (BAEUMLER et al., 2006; COSTA CRUSCIOL et al., 2013; FERNANDES et al., 2013; GREINER et al., 2005; HURST et al., 1999).

O objetivo da PCR consiste em multiplicar sequências específicas de DNA de forma que possam ser detectadas (ANKLAM et al., 2002; GACHET et al., 1998; HUBNER et al., 1999). Devido à capacidade desse procedimento de amplificar traços de DNA, todo cuidado deve ser tomado para que não ocorra contaminação das amostras, que resultem em resultados falso-positivos (HUBNER et al., 1999).

A PCR segue um processo semelhante de replicação do DNA que ocorre nas células (HOLST-JENSEN et al., 2003; KODAMA et al.,

2010; LIPP et al., 2005). A amplificação do DNA molde é feita *in vitro* sobre determinadas condições e na presença de iniciadores e da enzima DNA Polimerase. O uso de um par de iniciadores, que se anelam nas extremidades do segmento que será amplificado, permite que o segmento alvo seja amplificado exponencialmente, atingindo um elevado numero de cópias num curto intervalo de tempo (HOLST-JENSEN et al., 2003; LIPP et al., 2005; MEYER, 1999). A repetição dos ciclos da PCR permite atingir até 10^9 cópias do fragmento de interesse ao final da reação (HOLST-JENSEN et al., 2003).

A técnica da PCR consiste em repetidos ciclos de temperatura. Inicialmente é empregada alta temperatura para que a dupla fita de DNA seja desnaturada. Depois a temperatura é reduzida para o anelamento dos iniciadores e um novo aumento de temperatura vai permitir a extensão dos iniciadores. A temperatura de anelamento depende da sequencia dos iniciadores e da força iônica da solução (KUBISTA et al., 2006). A extensão do DNA é realizada pela enzima DNA polimerase e requer a presença de íons Mg, que são um cofator dessa enzima (SOMMA e QUERCI, 2006).

Após a realização da reação as amostras são submetidas à eletroforese para a visualização dos fragmentos que são separados em função do seu tamanho e sua carga (MOKHTARI et al., 2013).

A aplicação de metodologias de PCR requer o conhecimento das sequencias de DNA recombinante e da estrutura molecular do OGM para selecionar os iniciadores apropriados (ANKLAM et al., 2002; WURZ et al., 1999).

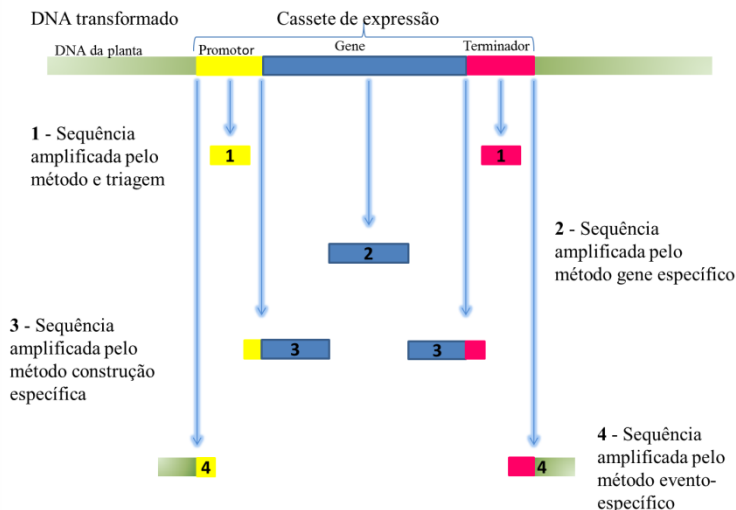
Os métodos de detecção de OGMs em alimentos utilizando a PCR podem ser divididos em quatro classes: métodos de triagem, gene específico, construção-específico e evento-específico, cada um deles apresenta um grau de especificidade (Figura 1.3) (HOLST-JENSEN et al., 2003; YANG et al., 2007):

- Métodos de triagem: não permitem a identificação do OGM, pois o alvo da amplificação por PCR é um elemento do DNA recombinante que é comum a vários OGMs (HOLST-JENSEN et al., 2003; MIRAGLIA et al., 2004; RONNING et al., 2003; WOLF et al., 2000; YANG et al., 2007). O DNA recombinante, em muitos casos, pode conter o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV 35S), ou o terminador nopalina sintase de *Agrobacterium tumefaciens* (T-Nos), ou os gene presentes nos vetores de clonagem, como o gene que codifica a resistência à ampicilina (*bla*) ou à neomicina/canamicina (*nptII*). No caso do método de triagem, o

alvo da amplificação é um desses elementos. Como esses elementos estão presentes em outros organismos, um resultado positivo pelo método de triagem não permite concluir que se trata de um OGM (HOLST-JENSEN et al., 2003).

- Método gene específico: o alvo da amplificação é o gene responsável pela característica da planta, sendo esse método mais específico que a triagem (HOLST-JENSEN et al., 2003; MIRAGLIA et al., 2004; RONNING et al., 2003; YANG et al., 2007).
- Método construção-específica: é mais específico que os dois anteriores. Nesse caso o alvo da amplificação é a região de junção de elementos adjacentes do DNA recombinante, que pode ser entre o promotor e o gene de interesse ou entre o terminador e o gene de interesse. O que pode acontecer é o fato da mesma construção estar presente em mais de um evento GM (HOLST-JENSEN et al., 2003; MIRAGLIA et al., 2004; YANG et al., 2007).
- Método evento-específico: é que apresenta a maior especificidade. Por esse método o alvo é a junção do DNA da planta com o DNA recombinante (BAEUMLER et al., 2006; HOLST-JENSEN et al., 2003; MIRAGLIA et al., 2004; RONNING et al., 2003). Esse método permite a distinção de um evento dos demais que contenham a mesma construção, possibilitando a distinção de eventos autorizados daqueles que não são (LIPP et al., 2005). Em geral, os métodos oficiais para quantificação de OGM em alimentos devem ser eventos-específicos (EC, 2003a).

Figura 1.3: esquema representativo dos alvos de detecção de OGMs



Fonte: adaptado de HOLST-JENSEN; DE LOOSE e VAN DEN EEDE (2006)

Holst-Jensen e Berdal (2004) estabeleceram uma abordagem modular para a análise dos OGMs. Por essa abordagem, cada etapa da análise de OGMs é chamada de módulo e o conjunto de módulos forma o método. Para que o método seja válido, todos os módulos também devem ser, mas eles podem ser validados separadamente. De acordo com essa nova abordagem, as classes de triagem e gene específico são agrupados numa única classe, chamada de elemento específico, que vai compreender a amplificação de um promotor, um terminador ou do próprio gene.

Por essa nova abordagem também se estabeleceu uma nova classe, chamada de espécie/táxon específico, cujo alvo é uma sequência conhecida e específica para a espécie/táxon em estudo. As outras duas classes permanecem inalteradas. Além desses 4 módulos, na análise de OGMs tem-se o módulo de preparo da amostra e da extração do DNA (HOLST-JENSEN et al., 2012).

Um dos problemas da PCR convencional é que ela não permite a quantificação de OGMs, como exigido pela legislação. Se a eficiência da PCR fosse de 100% e se mantivesse constante durante toda a reação, a concentração de DNA poderia ser calculada em relação à quantidade

de DNA alvo inicial adicionada à reação. No entanto, a eficiência de amplificação sofre alterações durante a reação pela presença de compostos inibidores, esgotamento de reagentes e aumento da viscosidade da mistura, etc. Essa alteração da eficiência ocorre, principalmente, nos ciclos avançados da reação (SPIEGELHALTER; LAUTER; RUSSELL, 2001). A integridade do DNA também pode afetar a eficiência da amplificação (DEMEKE e JENKINS, 2010). A eficiência da amplificação de PCR superior a 100% pode ser explicada por alguma conformação do DNA que impede que a enzima DNA polimerase tenha acesso ao alvo nos primeiros ciclos da PCR. Depois ocorre uma mudança na conformação desse DNA tornando mais cópias acessíveis (CANKAR et al., 2006). A variação no valor da eficiência da reação tem um grande efeito sobre o resultado da amplificação, como pode ser observado na equação básica da amplificação utilizando a PCR:

$$N_c = N_0 * (E + 1)^C$$

N_c corresponde ao número de fragmentos gerados na reação, N_0 corresponde ao número de fragmentos no início da reação, E é a eficiência da amplificação e C é o número de ciclos da reação (RUTLEDGE e COTÉ, 2003).

Como não é possível quantificar o DNA presente ao final da PCR convencional, a PCR em tempo real (qPCR) passou a ser empregada para a quantificação (ANKLAM et al., 2002).

1.6 PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

A PCR em tempo real quantitativa (qPCR) foi desenvolvida por Higuchi e colaboradores, em 1992. Esse método substituiu a PCR convencional, que apresenta desvantagens para sua aplicação, como alto custo, falta de automação e necessidade de etapas de pré- e pós-reação (HIGUCHI et al., 1992). A qPCR ocorre em ambiente fechado e acelera o processo de quantificação de DNA, além de reduzir a chance de contaminação cruzada (HERNANDEZ et al., 2005; HOLST-JENSEN et al., 2003). Essa PCR tem a vantagem que a amplificação das sequências de DNA alvo são acompanhadas durante toda a reação pelo monitoramento dos produtos formados. O monitoramento da reação consiste em acompanhar o aumento do sinal fluorescente gerado durante a PCR (ANKLAM et al., 2002), que ocorre de forma proporcional à quantidade de DNA alvo gerado em cada ciclo (WEIGHARDT, 2006).

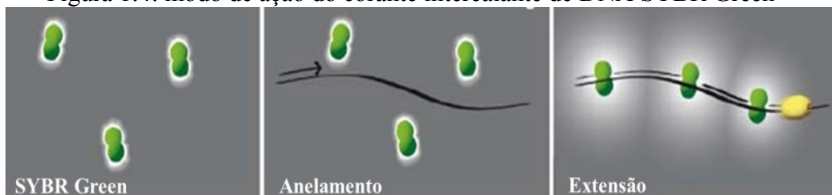
Um parâmetro importante na PCR em tempo real é o Ct, ou ciclo limiar (threshold), que consiste na quantidade de ciclos necessários para a geração de um sinal fluorescente estatisticamente significativo (ANKLAM et al., 2002). O Ct (ou Cq) é definido como o ciclo em que a curva de amplificação cruza a linha do threshold. O threshold é definido arbitrariamente com base na variação dos dados de base. Esse valor de Ct é usado para estimar a quantidade inicial de DNA alvo. Quanto menor a quantidade inicial de DNA alvo, maior será o valor de Ct obtido (HEID et al., 1996). Quando a PCR não resulta em um valor de Ct, interpreta-se que nenhuma amplificação exponencial foi obtida acima do ruído (BARBAU-PIEDNOIR et al., 2010; YE et al., 2002).

A PCR em tempo real pode utilizar fluoróforo intercalante de DNA ou sonda linear de hidrólise marcada para emissão da fluorescência (ANDERSEN et al., 2006). A substituição do brometo de etídio, empregado na PCR convencional, pelo corante SYBR Green aumentou a sensibilidade da PCR. O SYBR Green apresenta uma forte afinidade pelo DNA e uma fluorescência mais intensa que o brometo de etídio, quando ligado ao DNA (SCHNEEBERGER et al., 1995).

O SYBR Green é um corante intercalante que se liga à dupla fita de DNA e promove um aumento da fluorescência, que é proporcional à quantidade de DNA de dupla fita presente (Figura 1.4) (ANDERSEN et al., 2006). À medida que aumenta a quantidade de fragmentos sintetizados, ocorre um aumento do sinal fluorescente (WEIGHARDT, 2006). No entanto, o uso de corante intercalante de DNA não garante a amplificação apenas dos produtos de interesse, já que o corante se liga a qualquer dupla fita de DNA presente. Para a confirmação da amplificação do fragmento de interesse, é realizada a análise da curva de *melting* ou curva de dissociação, que é específica para cada fragmento (ANDERSEN et al., 2006; ANKLAM et al., 2002). Ao final da reação os produtos da PCR (dupla fita) são separados lentamente e os dados de fluorescência são medidos. Como cada fragmento tem uma temperatura teórica de *melting* (Tm) específica, que é dependente do tamanho do fragmento, do conteúdo de guanina e citosina (GC) da composição da sequência e da força iônica da solução, permitindo confirmar a presença do fragmento específico (KUBISTA et al., 2006; WEIGHARDT, 2006; BARBAU-PIEDNOIR et al., 2010; YE et al., 2002). O valor de Tm corresponde à temperatura na qual 50% das moléculas de DNA estão desnaturadas. Quanto maior for o tamanho da sequência e maior o conteúdo de GC, maior será a temperatura de *melting* (BARBAU-PIEDNOIR et al., 2010; YE et al., 2002). A possibilidade de diferenciação dos produtos de interesse e dos produtos de amplificação

inespecífica, como dímeros de iniciadores, é uma das vantagens do uso da qPCR, já que os dímeros, por se tratarem de fragmentos pequenos apresentam Tms menores (AHMED, 2003; KUBISTA et al., 2006).

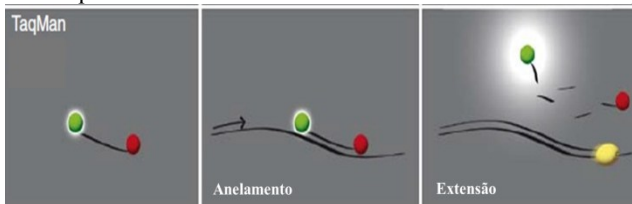
Figura 1.4: modo de ação do corante intercalante de DNA SYBR Green



Fonte: adaptado de GASPARIC et al. (2010)

Para evitar a ocorrência de amplificações inespecíficas, pode ser utilizada uma sonda linear de hidrólise (ANDERSEN et al., 2006; ANKLAM et al., 2002). A qPCR utilizando a sonda linear de hidrólise TaqMan difere da PCR utilizando corante intercalante de DNA devido a presença da sonda duplamente marcada. A sonda é um oligonucleotídeo que é complementar ao fragmento que será amplificado, ou seja, se liga a uma região interna aos dois iniciadores. Nesse caso, o produto da PCR só será detectado se a sonda se anelar ao DNA alvo. Em uma das extremidades da sonda há uma molécula fluorescente, chamada repórter e na outra extremidade apresenta uma molécula que absorve luz, chamada de supressor (quencher). Quando o repórter e o supressor estão próximos, o supressor impede a fluorescência do repórter. Durante a etapa de extensão do DNA a sonda é hidrolisada pela DNA polimerase e ocorre um afastamento do supressor e do repórter, permitindo que a fluorescência seja detectada (Figura 1.5) (ANDERSEN et al., 2006; BAYHA; GRAHAM; HERNANDEZ, 2008; HEID et al., 1996; NICKLAS e BUEL, 2003; SCHMIDT e PARROTT, 2001). O aumento da fluorescência do fluoróforo é proporcional à quantidade de produto de PCR que está sendo produzido. Esse produto, por sua vez, é proporcional à quantidade inicial do fragmento de interesse (GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996).

Figura 1.5: qPCR utilizando a sonda linear de hidrólise TaqMan



Fonte: adaptado de GASPARIC et al. (2010)

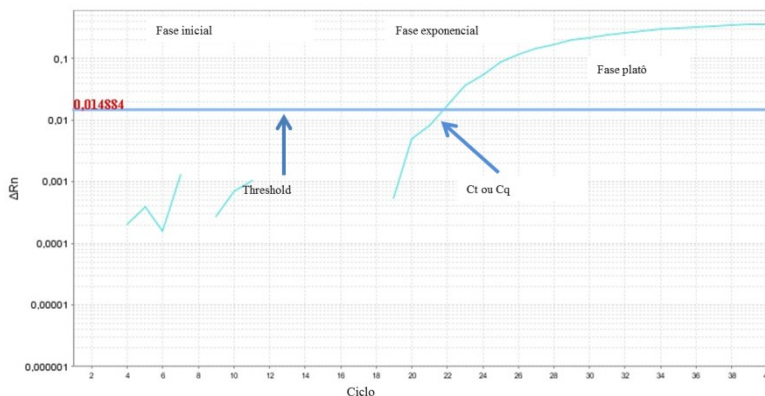
Quando uma sonda é desenvolvida, é necessário ter o cuidado de que a sonda deve se ligar ao DNA alvo antes que ocorra a extensão dos iniciadores. Se a temperatura de anelamento da sonda for menor ou próxima à temperatura de anelamento dos iniciadores, a extensão pode ser iniciada antes da ligação da sonda ao DNA molde (HOLLAND et al., 1991).

Um problema das sondas tradicionais é que são insensíveis a uma base não pareada, ou seja, se anelam mesmo que haja uma base diferente na sequência do DNA alvo, podendo levar à menor especificidade. Para aumentar a especificidade, foram desenvolvidas as sondas MGB (*minor groove binding*) (BAYHA et al., 2008). Essas sondas tem um agente ligado à extremidade 3' da sonda, que é responsável por aumentar o T_m da sonda e permite o desenvolvimento de sondas mais curtas. Essas sondas aumentam a sensibilidade a bases não pareadas (DORAK, 2007). O uso da sonda aumenta a especificidade e permite a amplificação de quantidades menores de DNA inicial (BAYHA et al., 2008). A aplicação de sondas lineares de análises de rotina tem a vantagem da rapidez e da aplicabilidade da análise de vários alvos em uma mesma corrida, pelo uso de diferentes fluoróforos (LAUBE et al., 2010).

As curvas de amplificação utilizando a qPCR são divididas em três fases. A primeira delas é chamada de fase inicial e corresponde aos primeiros ciclos da PCR, nos quais não é possível distinguir entre a fluorescência emitida e o ruído gerado pelo equipamento. A segunda fase é dita fase exponencial, havendo um aumento exponencial do sinal fluorescente gerado. A última fase é o platô, no qual não se observa aumento da fluorescência. Nessa fase os reagentes são escassos, além do acúmulo de inibidores que comprometem a eficiência da amplificação. A quantificação é realizada no início da fase exponencial (Figura 1.6). Um fluoróforo, chamado de referência passiva, está presente no tampão da PCR e é responsável pela normalização da fluorescência. Esse

tampão reduz os efeitos dos erros de pipetagem (HERNANDEZ et al., 2005).

Figura 1.6: curva de amplificação (ΔRn versus ciclo) apresentando as fases da PCR em tempo real, o threshold e o Ct.



Fonte: próprio autor

O uso de sonda TaqMan permite o acompanhamento da amplificação de múltiplos alvos na mesma reação, que é conhecida como PCR multiplex (JAMES et al., 2003). Contudo, a amplificação de múltiplos alvos na mesma reação requer o uso de diferentes fluoróforos repórter, que permitam a sua detecção separadamente no mesmo tubo (ANKLAM et al., 2002). A vantagem da PCR multiplex é a flexibilidade, a confiabilidade e o baixo custo (JAMES et al., 2003). Além do mais, o resultado obtido na PCR multiplex é mais acurado, já que ocorre uma redução do erro de pipetagem (LEE; KIM; YI, 2009). Contudo, a PCR multiplex encontra algumas dificuldades como o alcance de boas eficiências de amplificação para cada um dos alvos, independente da presença dos outros; o desenvolvimento de iniciadores e sondas que apresentem valores de temperatura de anelamento próximas e que não formem dímeros (FUCHS; CICHNA-MARKL; HOCHEGGER, 2013).

A qPCR tem se mostrado mais interessante que a PCR convencional mesmo para detecção, já que apresenta alta sensibilidade, os resultados apresentam alto rendimento, o sistema é automatizado e não são necessários procedimentos após a reação. Além disso, na qPCR

o risco de contaminação é reduzido, já que a reação e a análise são realizadas em confinamento (MARIA LOPEZ-CALLEJA et al., 2013).

A PCR e a qPCR são aceitas pelas autoridades regulamentadoras como método de detecção de sequências de DNA. No entanto, os resultados obtidos com essa metodologia podem ser afetados pela amostragem, o método empregado na extração do DNA, a presença de inibidores de PCR, o quanto o DNA foi degradado e, também, pelo tamanho do genoma da planta (BRANQUINHO; FERREIRA; CARDARELLI-LEITE, 2012).

1.7 EXTRAÇÃO DE DNA

Um requisito para os estudos moleculares é a obtenção de DNA de qualidade (ALJANABI e MARTINEZ, 1997). Para que a PCR apresente resultados confiáveis, é necessário que o DNA alvo seja de qualidade e em quantidade suficiente (AHMED et al., 2009; WAIBLINGER e GROHMANN, 2014). Não existe um protocolo de extração que possa ser empregado em larga escala. Normalmente, diferentes tecidos requerem diferentes protocolos de preparo da amostra e extração do DNA (ALJANABI e MARTINEZ, 1997). Na planta, o DNA está altamente empacotado e protegido por camadas de proteínas, em uma solução contendo muitos íons inorgânicos e compostos orgânicos, protegido por paredes e membranas celulares, dificultando sua extração (SPIEGELHALTER et al., 2001). Quanto maior o tamanho do genoma de uma planta, menor será o número de cópias de DNA alvo que estará presente numa quantidade determinada de DNA, por isso, a quantidade de DNA obtida na extração é bastante importante (GRYSON, 2010).

A obtenção de um DNA em quantidade suficiente e de qualidade, ou seja, que esteja livre de substâncias que possam prejudicar a PCR, é crucial. Os polissacarídeos, as proteínas, os compostos fenólicos e outros metabólitos secundários da planta (CANKAR et al., 2006), e até mesmo os reagentes utilizados para a extração do DNA (ANKLAM et al., 2002), podem inibir a PCR completamente, gerar resultados superiores aos esperados ou reduzir a eficiência da reação (ANKLAM et al., 2002; CANKAR et al., 2006). A presença de polissacarídeos, por exemplo, inibe a enzima DNA polimerase utilizada na PCR (ANKLAM et al., 2002). Se as enzimas utilizadas na lise celular (proteínases e desnaturases) não forem removidas, podem inativar a enzima DNA polimerase (WILSON, 1997). Somma (2006) cita ainda a presença de outros compostos como SDS, fenol, etanol, isopropanol, acetato de

sódio, cloreto de sódio, EDTA, hemoglobina, heparina como inibidores da PCR, dependendo da concentração presente. De acordo com Rossen et al. (1992), os inibidores da PCR podem atuar de diferentes maneiras, por precipitar o DNA, desnaturando a enzima DNA polimerase ou o próprio DNA, quelando os íons magnésio ou, ainda, adicionando um excesso desse íons.

Como a análise de OGMs envolve desde materiais puros até alimentos altamente processados, é necessário avaliar, para cada matriz alimentícia, um método de extração que seja adequado para produzir DNA de qualidade e em quantidade suficiente (CANKAR et al., 2006).

Cankar et al. (2006) avaliaram o efeito de cinco métodos de extração e de diferentes amostras na eficiência da PCR. Com os resultados obtidos conclui-se que cada método de extração deve ser validado para uma determinada matriz alimentícia.

O DNA pode ser facilmente degradado pelos processos de moagem, aquecimento, tratamento com ácidos, entre outros processos empregados na obtenção de produtos alimentícios, resultando em produtos com DNA de baixa qualidade. Além de afetar a detecção, a quantificação do OGM também é afetada pela degradação do DNA (ANKLAM et al., 2002; ENGEL et al., 2006; FERNANDES et al., 2013; HOLST-JENSEN et al., 2003).

Na extração de DNA a partir de materiais biológicos é necessário promover a lise celular, inativar todas as nucleases celulares e separar o DNA dos demais constituintes celulares. A lise celular pode ser realizada pelo rompimento mecânico, tratamento químico ou digestão enzimática. Para eliminar contaminantes do DNA, é realizada uma extração com solvente e, em geral, utiliza-se uma combinação de clorofórmio e fenol para a remoção das proteínas presentes na amostra. A precipitação do DNA é feita com o uso de etanol e isopropanol (SOMMA, 2006).

Os métodos de extração de DNA mais empregados são os métodos baseados em detergentes, com destaque para o método CTAB, e os kits comerciais que acompanham esferas magnéticas ou colunas de sílica (BRANQUINHO et al., 2012).

O método CTAB é bastante apropriado para a extração e purificação de DNA de plantas e de alimentos derivados de plantas. Nesse método a lise celular é realizada pelo detergente CTAB, que vai formar um complexo insolúvel com o DNA em baixas concentrações de sal. Os polissacarídeos, compostos fenólicos e outros contaminantes ficam na fase superior e podem ser removidos (SOMMA, 2006). As nucleases endógenas precisam ser inativadas, para isso utilizam-se

detergentes ou EDTA que se ligam ao magnésio, que é um cofator dessas enzimas. As proteínas são inativadas e degradadas pela adição de proteinase K (ANKLAM et al., 2002). Constituintes celulares hidrofóbicos (lipídeos e polifenóis) são removidos com um solvente orgânico, que pode ser o clorofórmio (ANKLAM et al., 2002). A extração prossegue com o uso do clorofórmio, que promove a desnaturação das proteínas e a separação de duas fases, uma aquosa e outra orgânica. A extração utilizando clorofórmio pode ser repetida várias vezes, para uma remoção completa das impurezas. A solubilização do DNA é realizada pelo aumento da concentração salina, utilizando cloreto de sódio (NaCl) e o DNA é precipitado com etanol (SOMMA, 2006).

Os kits comerciais para extração de DNA têm sido muito utilizados na obtenção de DNA de várias matrizes alimentícias que contêm OGMs. No entanto, os kits são adequados para a extração de DNA de algumas amostras, enquanto não são adequados para outras (DEMEKE e JENKINS, 2010). Em geral, o DNA obtido com o uso de kits comerciais com mini colunas apresenta uma maior qualidade, mas um rendimento menor (HERNANDEZ et al., 2005).

Olexova, Dovivovicova e Kuchta (2004) avaliaram três métodos de extração de DNA (CTAB, extração caotrópica em fase sólida (kit comercial) e extração não caotrópica) com relação ao rendimento de DNA, utilizando amostras de farinha, biscoitos, biscoitos contendo chocolate e papinhas instantâneas. Os resultados demonstraram que os três métodos foram eficazes para a extração de DNA de todas as amostras, no entanto, o método CTAB apresentou o melhor desempenho para todas as amostras.

Abdolmaleki et al. (2014) avaliaram a eficiência da extração de DNA de bananas e de produtos de banana congelados. Foram testados 5 métodos de extração: protocolo SDS, protocolo CTAB, protocolo CTAB modificado, dois Kits comerciais. A melhor pureza e rendimento de DNA foram obtidos com o protocolo CTAB modificado.

Branquinho, Ferreira e Cardarelli-Leite (2012) compararam dois métodos de extração de DNA com relação à concentração de DNA obtido, rendimento e pureza. Foram utilizados os métodos CTAB e o kit comercial DNeasy Plant Mini kit para a extração do DNA de amostras derivadas de soja produzidas por diferentes tratamentos. Ambos os métodos forneceram DNA de qualidade e em quantidade suficiente.

Após a extração, o DNA precisa ser quantificado. A quantificação do DNA é realizada pela medida da absorbância em luz ultravioleta. A medida da concentração do DNA é realizada pela medida

da absorvância a 260 nm. No comprimento de onda de 280 nm é medida a quantidade de proteínas. A relação entre a absorvância a 260 e 280 nm (260/280) é um indicativo da pureza do DNA. Uma razão de 1,8 indica DNA de alta pureza. A absorção no comprimento de onda de 230 nm indica a presença de carboidratos, fenóis, compostos aromáticos e peptídeos. Uma boa relação de absorvância entre 260 e 230 é de 2,2 (SOMMA, 2006).

1.8 CRITÉRIOS DE PERFORMANCE PARA A qPCR

A Rede Européia de Laboratórios de Análise de OGM (European Network of GMO Laboratories, ENGL) estabelece alguns critérios de aceitação que devem ser atingidos para que o método qPCR possa entrar num processo de validação internacional. Entre esses critérios podem ser citados: especificidade, faixa dinâmica, eficiência da amplificação, coeficiente de correlação, precisão, limite de detecção, entre outros (ENGL, 2008).

A eficiência da PCR depende da inclinação da reta obtida na curva de calibração de uma determinada amostra (SCHOLTENS et al., 2010). A curva de calibração ou curva padrão é obtida pela diluição seriada de uma amostra, partindo de uma solução contendo quantidade definida de DNA alvo puro, pode ser expressa em número de cópias do DNA alvo (SCHOLTENS et al., 2010). A eficiência é calculada a partir da seguinte equação:

$$E \text{ (eficiência) (\%)} = (10^{(-1/\alpha)} - 1) * 100$$

O α é o coeficiente angular da reta obtida na curva de calibração. Esse valor deve estar entre -3,1 e -3,6, o que resulta em uma eficiência entre 90 e 110% (ENGL, 2008).

O coeficiente R^2 é o coeficiente de correlação obtido pela regressão linear da curva padrão. Esse valor deve ser superior a 0,98 (ENGL, 2008).

A precisão corresponde aos resultados obtidos utilizando o mesmo método, as mesmas amostras, o mesmo laboratório, com análises realizadas pelo mesmo operador, no mesmo equipamento, num curto intervalo de tempo. Resumidamente, corresponde à repetição dos resultados obtidos em PCRs realizadas sob as mesmas condições (ENGL, 2008).

O limite de detecção (LOD) é avaliado utilizando uma diluição seriada da amostra de DNA, com diferentes números de cópias do DNA

alvo (ZEL et al., 2008). Segundo o ENGL (2008) esse valor corresponde a menor quantidade de um analito que pode ser detectada com confiança. O critério de aceitação é de que o analito seja detectado em 95% das análises para ser considerado como LOD.

Conhecendo-se o tamanho do genoma é possível estimar a massa de 1 cópia do genoma. Considerando que o genoma do feijão *Phaseolus vulgaris* L. contém 637 Mpb (ARUMUGANATHAN e EARLE, 1991). A massa de uma cópia do genoma é estimada pela seguinte fórmula:

$$m = n * 660 / (6,023 * 10^{23})$$

Onde m corresponde a massa de uma cópia de DNA, n corresponde ao tamanho do genoma da planta sob estudo (pb) , 660 (Da/bp) corresponde ao peso molecular médio das bases nitrogenadas e $6,023 * 10^{23}$ (mol^{-1}) corresponde à constante de Avogadro.

Com esse dado é possível estimar o número de cópias de DNA na curva de calibração, que varia de 10^5 a 10^0 cópias e que correspondem a massa de DNA que varia de 69,8 a $6,98 * 10^{-4}$ ng para o feijoeiro.

1.9 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO EVENTO-ESPECÍFICA DE OGMS

Em muitos casos, a mesma construção de DNA recombinante está presente em mais de um OGM, e nem todos eles são aprovados para comercialização. Os eventos de milho MON802, MON809 e MON810 apresentam a mesma construção que o milho MON810 (HOLCK et al., 2002). Cada um desses OGMS é considerado um evento diferente (HOLST-JENSEN et al., 2003). Como a inserção do DNA recombinante ocorre de forma casual, existe uma grande chance de que a região de junção do DNA do receptor com o DNA recombinante seja única para cada evento de transformação. Nesse contexto justifica-se a importância do desenvolvimento de métodos evento-específicos para a detecção de um OGM (HOLCK et al., 2002), como exigido pela legislação europeia (EC, 2003b).

Wu et al. (2013) desenvolveram um método evento-específico para a quantificação por qPCR do evento TT51-1 de arroz. Esse arroz apresenta resistência a inseto. Foi desenvolvido um ensaio colaborativo para validar o método, que envolveu seis laboratórios. A partir do DNA genômico do arroz TT51-1 foram preparadas diluições seriadas para a construção de curvas padrão. As análises de qPCR foram realizadas com os iniciadores evento-específicos e com iniciadores que amplificam uma

região do gene da fosfolipase D, que é utilizado como referência endógena para o arroz. As curvas de *Ct versus* o logaritmo do nº de cópias de DNA apresentaram boa linearidade, com coeficientes de regressão (R^2) de acordo com os requerimentos para métodos de análise de OGMs. Uma eficiência média foi calculada com todos os dados obtidos, sendo de 96% para o gene de referência endógena e de 95% para o ensaio evento-específico.

O evento GM EE-1 corresponde a berinjela Bt que foi desenvolvida para conferir resistência a insetos, com a inserção do gene *cryIAC*. Esse OGM será o primeiro alimento geneticamente modificado comercializado na Índia. Randhawa, Sharma e Singh (2012) desenvolveram ensaios evento-específicos utilizando a PCR convencional e a qPCR para a detecção desse evento. A PCR convencional foi utilizada para testar a especificidade do ensaio evento-específico. Esse teste não mostrou amplificação em controles negativos, demonstrando que permite a diferenciação do evento EE-1 dos demais eventos de transformação que expressam as proteínas *cryIF* e *cry IAb* e outros evento que apresentam o gene *cryIAC*, que conferem a resistência a insetos nos demais OGMs. A especificidade dos iniciadores também foi testada na qPCR, com resultado positivo apenas nas amostras de berinjela EE-1. O fragmento gerado pelo ensaio evento-específico foi utilizado para produzir um plasmídeo calibrante, que foi utilizado para a produção de curvas de calibração contendo de 10^8 a 10^0 cópias de DNA. O coeficiente de regressão (R^2) obtido foi de 0,999. O método desenvolvido tem um grande potencial para uso na análise quantitativa da berinjela Bt.

Na Coreia existem cerca de 80 eventos biotecnológicos aprovados. Com o intuito de desenvolver um método capaz de detectar simultaneamente vários eventos GM, Lee et al. (2014) desenvolveram um PCR multiplex para a detecção simultânea de cinco eventos de milho GM: MIR604, evento 3272, LY038, MON88017 e DAS-59122-7. A PCR multiplex apresentou um LOD de 0,5%. Na Coreia a legislação exige rotulagem quando a quantidade de OGM é superior a 3%. Na União Europeia o limite para rotulagem é de 0,9%, portanto o método desenvolvido pode ser aplicado para análise de OGM ao redor do mundo.

O linho geneticamente modificado CDC Triffid (FP967) apresenta resistência a herbicidas que contem sulfoniluréia, esses herbicidas são bastante utilizados pelos fazendeiros, pois apresentam bons resultados em baixas dosagens. Esse evento é liberado para comercialização nos EUA e no Canadá, mas não é liberado na União

Europeia e Suíça. Em 2009, a Alemanha detectou a presença do linho GM não autorizado em um navio canadense. Nesse país a tolerância para eventos não autorizados é zero. Naquele momento foi feita uma análise construção-específica, amplificando a região de junção do terminador Nos e o gene de resistência a espectinomicina. No entanto, um método de detecção evento-específico seria mais adequado, pois muitos OGMs apresentam o mesmo DNA recombinante (VANELLA et al., 2014). Nesse contexto, Vanella et al. (2014) desenvolveram um ensaio evento-específico para detecção e quantificação do linho FP967. Para avaliar o método, os autores prepararam curvas de diluição seriada e testaram a reprodutibilidade. Na PCR convencional o LOD foi estabelecido em 0,01%. A especificidade dos iniciadores não demonstrou amplificação de DNA de outros eventos GM, linho não-GM e outras culturas não-GM. Na análise quantitativa, as eficiências obtidas nas curvas de diluição seriada ficaram em torno de 100%, e os valores de R^2 entre 0,97 e 0,99. O LOD do ensaio quantitativo foi avaliado através das curvas de diluição seriada contendo de 280 a 4 cópias do DNA do linho GM. O LOD estabelecido foi de 9 cópias de DNA. O LOD também foi avaliado através da diluição de linho GM em linho não-GM, para avaliar o efeito matriz no LOD. Nesse teste foi possível detectar 0,05% de conteúdo GM na mistura.

O mamão papaia é uma fruta importante nas regiões tropicais e subtropicais. No entanto essa cultura sofre sérios problemas devido ao vírus do mosaico do mamoeiro. Com o intuito de reduzir as perdas causadas por esse vírus, foram desenvolvidos mamões resistentes ao vírus. O primeiro mamão resistente ao vírus foi desenvolvido no Havaí, em 1998, conhecido como papaia 55-1. Esse mamão é liberado para comercialização no Canadá, Japão e Estados Unidos. Noguchi et al. (2013) desenvolveram um método evento-específico por qPCR para a detecção do evento papaia 55-1. Esse método foi validado através de uma validação interlaboratorial, que contou com a colaboração de 12 laboratórios. O estudo de validação envolveu o procedimento de extração e a análise de qPCR. A qualidade do DNA extraído nos 12 laboratórios mostrou-se suficiente para o uso nas análises de PCR. Os valores de Ct obtidos nas análises demonstraram que o método apresenta elevada repetibilidade e reprodutibilidade.

O tomate é uma importante fruta cultivada no mundo. Até 2011 já existiam 8 tomates GMs aprovados para comercialização. O tomate Huafan No. 1 foi desenvolvido com um gene que atrasa o processo de maturação da fruta. Yang, Zhang e Yang (2013) desenvolveram um estudo para análise evento-específica por PCR para a detecção e

quantificação desse tomate GM. Na análise qualitativa utilizando os iniciadores evento-específicos só foi verificada a amplificação nas amostras de tomate Huafan No. 1. O LOD do ensaio qualitativo foi estabelecido em 20 cópias de DNA. Nesse estudo não foi possível desenvolver uma sonda TaqMan para o ensaio evento-específico, pois a região de junção do DNA recombinante com o DNA da planta apresentava uma alta porcentagem de A/T e uma longa sequência de bases adenina (A). Portanto, os autores empregaram o fluoróforo SYBR Green para a quantificação evento-específica. Igualmente, os autores prepararam diluições seriadas de DNA de tomate Huafan No.1. Os resultados das curvas de amplificação mostraram bons coeficientes de regressão ($R^2 = 0,998$). A repetibilidade e a reprodutibilidade do ensaio também foram avaliadas e os resultados demonstraram que o ensaio desenvolvido foi confiável para a quantificação do tomate Huafan No.1. O LOD estabelecido para o método foi de 5 cópias de DNA.

O milho LY038 foi desenvolvido para expressar uma enzima regulatória na via de biossíntese da lisina. Esse milho apresenta um maior conteúdo de lisina livre no grão, quando comparado ao milho convencional. Zhang et al. (2011) estabeleceram um método evento-específico para a detecção e quantificação do milho LY038. A PCR qualitativa utilizando os iniciadores apresentou o fragmento de interesse apenas nas amostras de milho LY038, sem amplificação em outras amostras de milho GM, arroz GM e soja GM. A sensibilidade da detecção foi avaliada diluindo DNA de milho LY038 no DNA de sua isolinha não GM, mostrando que o método é capaz de detectar 0,1% do OGM, que corresponde a 37 cópias de DNA com base no genoma haploide do milho.

O evento de soja A2704-12 apresenta tolerância a herbicida. Com o intuito de desenvolver um método útil para os órgãos regulatórios, Ma et al. (2014) desenvolveram um método evento-específico para a detecção e quantificação desse evento de soja. Na PCR qualitativa o LOD obtido foi de 0,05%. Na PCR quantitativa o LOD foi menor que 0,01%. Os mesmos iniciadores utilizados na PCR qualitativa puderam ser aplicados na PCR quantitativa, uma vantagem para esse método. Além disso, a PCR quantitativa pode ser realizada com o fluoróforo SYBR Green, que é mais barato.

Além dos trabalhos citados anteriormente, a tabela 1.1 apresenta outros trabalhos em que foram desenvolvidos ensaios evento-específicos para a detecção e quantificação de OGMs.

Tabela 1.1: trabalhos que desenvolveram ensaios evento específicos para a detecção e quantificação de OGMs (continua).

Nome da cultura	Nome do OGM	Característica	Autor (es)
Arroz	TT51-1	Resistência à insetos	Wu et al. (2013)
	Kefeng 6	Resistência à insetos	Guertler et al. (2012)
	Kefeng 8	Resistência à insetos	Wang et al. (2012)
	114-7-2	Produção de soroalbumina humana	Zhang, Huang a Zhu (2014)
Berinjela	EE-1	Resistencia à insetos	Randhawa, Sharma e Singh (2012)
Trigo	B73-6-1	Aumento da qualidade da farinha	Xu et al. (2013)
Linho	CDC Triffid (FP967)	Tolerância à herbicida	Vanella et al. (2014)
Soja	DP -356043-5	Tolerância à herbicida	Xu et al. (2011)
	MON89788	Tolerância à herbicida	Takabatake et al. (2010)
	A2704-12	Tolerância à herbicida	Ma et al. (2014)
	A2704-12	Tolerância a herbicida	Li et al. (2011)
	A5547-127	Tolerância a herbicida	Li et al. (2011)
	DP-356043-5	Tolerância a herbicida	Xu et al. (2011)
Papaia	55-1	Resistência a vírus	Noguchi et al. (2013)
	Huanong No. 1	Resistência a vírus	Guo et al. (2009)
Repolho chinês	---	Resistência a insetos	Shin et al. (2012)
Tomate	Huafan No. 1	Amadurecimento retardado	Yang, Zhang e Yang (2013)
Milho	LY038	Grãos com elevados níveis de lisina livre	Zhang et al. (2011)
	MIR604	Resistencia a insetos	Mano et al. (2012)
Algodão	MON15985	Resistencia a insetos	Jiang et al. (2010)

(continuação) trabalhos que desenvolveram ensaios-evento específicos para a detecção e quantificação de OGMs.

Nome da cultura	Nome do OGM	Característica	Autor (es)
Canola	Topas 19/2	Tolerância a herbicida	Wu et al. (2009)

Fonte: próprio autor

1.10 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FEIJÃO GM EMBRAPA 5.1

Dinon et al. (2012) desenvolveram iniciadores e sondas para uma referência endógena do feijão *Phaseolus vulgaris* L., chamado de ensaio FEI, e para um fragmento construção específico na região de junção do promotor 35S com a sequência do gene de replicação viral AC1, chamado de ensaio OLA. Os iniciadores para a detecção de feijão (referência endógena) apresentaram os resultados esperados para as 8 variedades de feijão *Phaseolus vulgaris* L. testadas. Em nenhum dos controles negativos testados foi verificada amplificação do fragmento de interesse. O mesmo ocorreu nas reações utilizando os iniciadores para o fragmento construção-específica, com amplificação dos feijões GM e nenhuma amplificação nas amostras não-GM. O LOD dos métodos foi avaliado através de curvas de diluição seriada contendo de 10^5 a 10^0 cópias de DNA. O LOD dos dois ensaios foi de 10^2 cópias de DNA. Os autores ainda avaliaram o LOD do ensaio quando o DNA do feijão GM foi diluído em amostra de DNA não-GM (isolinha não-GM, lentilha, ervilha, soja e arroz). O LOD para o ensaio FEI foi de 10^1 cópias de DNA. Para o ensaio OLA o LOD foi de 10^2 cópias, pois não houve amplificação de DNA para 10^1 cópias quando o DNA GM foi diluído em DNA da sua isolinha e de lentilha. Os iniciadores e sondas desenvolvidos apresentaram alta especificidade.

Para que a detecção e quantificação do feijão Embrapa 5.1 seja confiável em alimentos, é necessário validar metodologias e sistemas calibrantes. Nesse contexto, Brod et al. (2013) desenvolveram um plasmídeo calibrante para a quantificação do feijão GM 5.1. O plasmídeo calibrante é um tipo de material certificado de referência, que foi desenvolvido para solucionar algumas limitações das misturas de pós-secos, com base na massa, usados como material de referência. O plasmídeo calibrante contém uma sequência específica do evento GM e um fragmento de uma referência endógena, na proporção de 1:1. Na construção do plasmídeo calibrante foi utilizado um fragmento

construção-específico, na região de junção do promotor P35S e o elemento AC1, com 339 pares de base. Para a referência endógena foi utilizado um fragmento do promotor PvSR2 com o sítio de restrição da enzima NdeI, com 489 pares de base. O plasmídeo foi diluído para uma concentração de 2,13 ng/ μ L, que corresponde a 10^9 cópias de DNA plasmidial. A partir dessa solução inicial, foi feita uma diluição seriada para ser usada como alvo na amplificação por PCR, gerando curvas de diluição seriada. Os resultados de eficiência obtidos, em nove corridas de PCR, para o fragmento construção-específico e para o fragmento da referência endógena variaram de 75 a 87% e de 68 a 81%, respectivamente. O limite de detecção (LOD) para o plasmídeo foi de 10^3 cópias de DNA. Esse LOD é suficiente para detectar 0,67% do feijão GM Embrapa 5.1 em 100 ng de DNA genômico.

Os iniciadores desenvolvidos por Dinon et al. (2012) apresentaram resultados heterogêneos entre as diferentes variedades de feijão, ou seja, os valores de Ct obtidos para as diferentes variedades apresentaram valores muito distintos. Na tentativa de estabelecer uma nova referência endógena, Venturelli et al. (2014) testaram três genes que codificam proteínas do feijão como candidatos à referência endógena. Foram testados os genes da faseolina, da arcelina e da lectina. A especificidade dos iniciadores desenvolvidos para esses alvos foi testada com SYBR Green. Os iniciadores para o gene da arcelina não apresentaram resultados na amplificação ou, no caso de sinal positivo, o Ct obtido era tardio. Os iniciadores para o gene da faseolina apresentaram, para amostras positivas, valores de Ct menores que os iniciadores da lectina. No entanto, foi verificada a amplificação de controles negativos, e os fragmentos apresentavam valores de Tm muito similares aos controles positivos. Os iniciadores para o gene da lectina apresentam Cts tardios (>35) para os controles negativos, mas os valores de Tm eram diferentes do valor de Tm do fragmento de interesse. Como os iniciadores para o gene da lectina apresentaram os melhores resultados, foi desenvolvida uma sonda TaqMan para esse gene. A homogeneidade do ensaio da lectina foi avaliada pela análise de 50 amostras de diferentes variedades de feijão. As amostras apresentaram a amplificação esperada com um Ct médio de $20,3 \pm 0,73$. Os iniciadores e a sonda desenvolvidos apresentaram resultados de eficiência de amplificação que variaram de 95 a 100% para as amostras de Pérola e Pontal não GM e amostras de Pérola e Pontal GM.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE UM ENSAIO qPCR EVENTO- ESPECÍFICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE FEIJÃO GENETICAMENTE MODIFICADO EMBRAPA 5.1 COM UMA SONDA DE HIDRÓLISE

**OS RESULTADOS OBTIDOS NESSE TRABALHO ESTÃO
PUBLICADOS NO JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD
CHEMISTRY (<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf503928m>)**

Artigo publicado:

TREML, D.; VENTURELLI, G. L.; BROD, F. C. A.; FARIA, J. C.; ARISI, A. C. M. Development of an Event-Specific Hydrolysis Probe Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Embrapa 5.1 Genetically Modified Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2014. DOI: 10.1021/jf503928m

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para o desenvolvimento de um novo método para a detecção e quantificação específica do feijão GM Embrapa 5.1 foram desenhados iniciadores para a região de junção do DNA do feijão com o DNA recombinante. Os iniciadores apresentaram especificidade para a amplificação do DNA do feijão GM quando foi utilizado com a tecnologia SYBR Green na concentração de iniciadores de 300 nM. Nessa concentração poucos controles negativos apresentaram sinal positivo e, ainda assim, com Cts tardios, sendo considerados resultados falso positivos.

O teste de especificidade da sonda FGM desenvolvida apresentou melhores resultados que o ensaio com a tecnologia SYBR Green, demonstrando que a sondas realmente aumentam a especificidade da reação. Os critérios de performance avaliados com a sonda FGM apresentaram resultados muito satisfatórios, dentro dos limites estabelecidos pelos guias internacionais (ENGL).

Um ponto importante verificado nesse trabalho é que os iniciadores e a sonda desenvolvidos apresentam alta especificidade para o feijão Embrapa 5.1, permitindo diferenciá-lo de outros eventos de feijão GM ainda não autorizados para comercialização no Brasil. Além disso, as duas metodologias empregadas na extração do DNA se mostraram efetivas, sendo que a extração com DNeasy Plant mini kit apresentou o melhor desempenho.

O par de iniciadores e a sonda desenvolvida nesse trabalho podem ser utilizados como ferramenta para a quantificação do feijão Embrapa 5.1. Os próximos passos serão um estudo interlaboratorial para validação dos ensaios FGM e LEC e a construção de um plasmídio calibrante contendo o fragmento evento-específico e uma referência endógena do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*).

REFERÊNCIAS

ABDOLMALEKI, F. et al. Impact of fruit processing methods on DNA extraction from transgenic frozen banana products. **European Food Research and Technology**, v. 239, n. 3, p. 509-517, Sep 2014.

AHMED, F. E. Genetically modified probiotics in foods. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 11, p. 491-497, Nov 2003.

AHMED, I. et al. High-quality plant DNA extraction for PCR: an easy approach. **J Appl Genet**, v. 50, n. 2, p. 105-7, 2009.

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, Nov 15 1997.

ANDERSEN, C. B. et al. Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9658-9663, Dec 27 2006.

ANDERSON, J. W.; SMITH, B. M.; WASHNOCK, C. S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 3, p. 464S-474S, Sep 1999.

ANKLAM, E. et al. Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. **European Food Research and Technology**, v. 214, n. 1, p. 3-26, Jan 2002.

ARAGÃO, F. J. L. et al. Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the Bean golden mosaic virus. **Journal of Biotechnology**, v. 166, n. 1-2, p. 42-50, Jun 20 2013.

ARAGÃO, F. J. L.; FARIA, J. C. First transgenic geminivirus-resistant plant in the field. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 1086-1088, Dec 2009.

ARAGÃO, F.; FARIA, J. First Transgenic Geminivirus-resistant Plant in the Field The Development of a RNAi-based Agriculture Technology. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 46, p. S5-S5, Spr 2010.

ARUMUGANATHAN, K.; EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 9, n. 3, p. 208-218, 1991/08/01 1991.

BAEUMLER, S. et al. A real-time quantitative PCR detection method specific to widestrike transgenic cotton (event 281-24-236/3006-210-23). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 18, p. 6527-6534, Sep 6 2006.

BARBAU-PIEDNOIR, E. et al. SYBR(A (R))Green qPCR screening methods for the presence of "35S promoter" and "NOS terminator" elements in food and feed products. **European Food Research and Technology**, v. 230, n. 3, p. 383-393, Jan 2010.

BAWA, A. S.; ANILAKUMAR, K. R.: Genetically modified foods: safety, risks and public concerns - a review. **Journal of Food Science and Technology** 2012.

BAYHA, K. M.; GRAHAM, W. M.; HERNANDEZ, F. J., JR. Multiplex assay to identify eggs of three fish species from the northern Gulf of Mexico, using locked nucleic acid Taqman real-time PCR probes. **Aquatic Biology**, v. 4, n. 1, p. 65-73, 2008.

BONFIM, K. et al. RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 6, p. 717-726, Jun 2007.

BRANQUINHO, M. R.; FERREIRA, R. T. B.; CARDARELLI-LEITE, P. Survey of compliance with labeling legislation in food containing GMOs in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 3, p. 220-225, May 2010.

_____. Use of real-time PCR to evaluate two DNA extraction methods from food. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 32, n. 1, p. 112-118, 2012.

BRASIL. Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). 2º Levantamento de Grãos – SAFRA 2014/2015. Disponível em: http://www.conab.gov.br/olalacms/uploads/arquivos/14_11_13_09_19_35_boletim_graos_novembro_2014.pdf, acesso em: 20/11/14.

_____. Decreto nº. 4.680, 24 de abril de 2003. Regulamenta o direito à informação, assegurado pela lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990, quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que contenham ou sejam produzidos a partir de organismos geneticamente modificados, sem prejuízo do cumprimento das demais normas aplicáveis. **D.O.U. Diário Oficial da União**, Brasília, Brasil, 2003.

_____. Instrução normativa nº 12, de 28 de março de 2008. Regulamento técnico do feijão. **D.O.U. Diário Oficial da União**, Brasília, 31 de março de 2008.

_____. Lei nº 11.105, 24 de março de 2005. Regulamenta os itens II, IV e V do parágrafo 1º do artigo 225 da constituição federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados. **D.O.U. Diário Oficial da União**, Brasília, Brasil. 2005

BROD, F. C. A. et al. Development of Plasmid DNA Reference Material for the Quantification of Genetically Modified Common Bean Embrapa 5.1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 4921-4926, May 22 2013.

CAMPOS-VEGA, R. et al. Chemical Composition and In Vitro Polysaccharide Fermentation of Different Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Food Science**, v. 74, n. 7, p. T59-T65, Sep 2009.

CANKAR, K. et al. Critical points of DNA quantification by real-time PCR - effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. **Bmc Biotechnology**, v. 6, Aug 14 2006.

CAPRIOARA-BUDA, M. et al. Evaluation of plasmid and genomic DNA calibrants used for the quantification of genetically modified organisms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 1, p. 29-42, Jul 2012.

CARDADOR-MARTINEZ, A.; LOARCA-PINA, G.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 24, p. 6975-80, Nov 20 2002.

CHAOUACHI, M. et al. Development of a real-time PCR method for the differential detection and quantification of four Solanaceae in GMO analysis: Potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), eggplant (*Solanum melongena*), and pepper (*Capsicum annuum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 6, p. 1818-1828, Mar 26 2008.

COSTA CRUSCIOL, C. A. et al. Foliar application of stabilized silicic acid on soybean, common bean, and peanut. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 44, n. 2, p. 404-410, Apr-Jun 2013.

CTNBIO. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Resumo geral de plantas geneticamente modificadas aprovadas para comercialização. Disponível em: http://www.ctnbio.gov.br/upd_blob/0001/1873.pdf, acesso em 02/12/14.

DE FARIA, L. C. et al. Genetic progress during 22 years of improvement of carioca-type common bean in Brazil. **Field Crops Research**, v. 142, p. 68-74, Feb 20 2013.

DEL GAUDIO, S. et al. Verification of Real-Time PCR Methods for Qualitative and Quantitative Testing of Genetically Modified Organisms. **Journal of Food Quality**, v. 35, n. 6, p. 442-447, Dec 2012.

DEMEKE, T.; JENKINS, G. R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Anal Bioanal Chem**, v. 396, n. 6, p. 1977-90, Mar 2010.

DEVI, M. J. et al. Comparison of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes for nitrogen fixation tolerance to soil drying. **Plant and Soil**, v. 364, n. 1-2, p. 29-37, Mar 2013.

DINON, A. Z. et al. Primers and Probes Development for Specific PCR Detection of Genetically Modified Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Embrapa 5.1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4672-4677, May 9 2012.

_____. Development and validation of real-time PCR screening methods for detection of cry1A.105 and cry2Ab2 genes in genetically modified organisms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 5, p. 1433-1442, May 2011.

DORAK, M. T. Real-Time PCR. Taylor & Francis Group, 2007.

EC. European Commission. Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. **Official Journal of the European Union**, 2003, L 268, pp.1-23 (a).

EC. European Commission. Regulation 1830/2003 of 22 September 2003, concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms. **Off. J. Eur. Commun.** 2003, L268, 24–28 (b).

EC. European Commission. Regulation 619/2011 of 24 June 2011, laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed as regards presence of genetically modified material for which an authorization procedure is pending the authorization of which has expired. **Off. J. Eur. Commun.** 2011, L166, 9–15.

EMBRAPA. Cultivo de feijão irrigado na Região Noroeste de Minas Gerais. Sistemas de produção, Nº 5, dezembro de 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrrigadoNoroesteMG/pragas.htm>, acesso em 26/11/14.

ENGEL, K. H. et al. Quantification of DNA from genetically modified organisms in composite and processed foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 9, p. 490-497, 2006.

ENGL. European Network of Genetically Modified Organisms Laboratories. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing, 2008.

FARIA, J. C. et al. RNAi-based Bean golden mosaic virus-resistant common bean (Embrapa 5.1) shows simple inheritance for both transgene and disease resistance. **Plant Breeding**, v. 133, n. 5, p. 649-653, Oct 2014.

FARIA, J. C.; YOKOYAMA, M. Integração da avaliação de danos causados pelo mosaico dourado do feijoeiro: o papel de culturas hospedeiras do vetor do vírus e manejo da praga e doença. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2008.

FERNANDES, T. J. R.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; MAFRA, I. Tracing transgenic maize as affected by breadmaking process and raw material for the production of a traditional maize bread, broa. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 687-692, May 1 2013.

FUCHS, M.; CICHNA-MARKL, M.; HOCHEGGER, R. Development and validation of a duplex real-time PCR method for the simultaneous detection of celery and white mustard in food. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 229-235, Nov 1 2013.

GACHET, E. et al. Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 11-12, p. 380-388, Nov-Dec 1998.

GASPARIC, M. B. et al. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 6, p. 2023-2029, Mar 2010.

GIBSON, U. E. M.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 995-1001, Oct 1996.

GREINER, R.; KONIETZNY, U.; VILLAVICENCIO, A. Qualitative and quantitative detection of genetically modified maize and soy in processed foods sold commercially in Brazil by PCR-based methods. **Food Control**, v. 16, n. 8, p. 753-759, Oct 2005.

GRYSON, N. Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 6, p. 2003-2022, Mar 2010.

GUERTLER, P. et al. Development of an event-specific detection method for genetically modified rice Kefeng 6 by quantitative real-time PCR. **Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit**

Journal of Consumer Protection and Food Safety, v. 7, n. 1, p. 63-70, Mar 2012.

GUO, J. C. et al. Characterization of the Exogenous Insert and Development of Event-specific PCR Detection Methods for Genetically Modified Huanong No. 1 Papaya. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7205-7212, Aug 2009.

HEID, C. A. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, Oct 1996b.

HERNANDEZ, M.; RODRIGUEZ-LAZARO, D.; FERRANDO, A. Current methodology for detection, identification and quantification of genetically modified organisms. **Current Analytical Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 203-221, Jun 2005.

HIGUCHI, R. et al. Simultaneous amplification and detection of specific dna-sequences. **Bio-Technology**, v. 10, n. 4, p. 413-417, Apr 1992.

HOLCK, A. et al. 5'-nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard maize (vol 214, pg 449, 2002). **European Food Research and Technology**, v. 215, n. 2, p. 182-182, Aug 2002.

HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 16, p. 7276-80, Aug 15 1991.

HOLST-JENSEN, A. et al. Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1318-1335, Nov-Dec 2012.

HOLST-JENSEN, A. et al. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, n. 8, p. 985-993, Apr 2003.

HOLST-JENSEN, A. Testing for genetically modified organisms (GMOs): Past, present and future perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 1071-1082, Nov-Dec 2009.

HOLST-JENSEN, A.; BERDAL, K. G. The modular analytical procedure and validation approach and the units of measurement for genetically modified materials in foods and feeds. **Journal of Aoac International**, v. 87, n. 4, p. 927-936, Jul-Aug 2004.

HOLST-JENSEN, A.; DE LOOSE, M.; VAN DEN EEDE, G. Coherence between legal requirements and approaches for detection of genetically modified organisms (GMOs) and their derived products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 8, p. 2799-2809, Apr 19 2006.

HUBNER, P. et al. Detection of genetically modified organisms in food: critical points for duality assurance. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 4, n. 7, p. 292-298, Jul 1999.

HURST, C. D.; KNIGHT, A.; BRUCE, I. J. PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs. **Molecular Breeding**, v. 5, n. 6, p. 579-586, Dec 1999.

JAMES, C. Global biotech/ gm crop plantings increase 100-fold from 1996. Developing countries, including new adopters sudan and cuba, now dominate use of the technology. Vol. 44, international service for the aquisition of agro-biotech applications: ithaca, NY. Disponível em: <http://isaaa.org/resources/publications/briefs/44/pressrelease/default.asp>, acesso em 26/07/2013. 2013.

JAMES, C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2013. Eighteen million farmers in 27 countries chose biotech crops in 2013, global plantings increase by 5 million hectares, 2014. *ISAAA BRIEF* NO. 46. ISAAA: ITHACA, NY. Disponível em: <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/46/pressrelease/default.asp>, acesso em 20/11/2014.

JAMES, D. et al. Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 20, p. 5829-5834, Sep 24 2003.

JAPAN. Ministry of Agriculture Forestry and Fisheries. Food and Marketing Bureau. **Notification n. 1775**. Tokyo, Japan, 2000.

JIANG, L. et al. International Collaborative Study of the Endogenous Reference Gene, Sucrose Phosphate Synthase (SPS), Used for Qualitative and Quantitative Analysis of Genetically Modified Rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 9, p. 3525-3532, May 13 2009.

JIANG, L. X. et al. Development and in-house validation of the event-specific qualitative and quantitative PCR detection methods for genetically modified cotton MON15985. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 3, p. 402-408, Feb 2010.

KODAMA, T. et al. Tendency for Interlaboratory Precision in the GMO Analysis Method Based on Real-Time PCR. **Journal of Aoac International**, v. 93, n. 2, p. 734-749, Mar-Apr 2010.

KOREA. Ministry of Agriculture and Forestry. **Notification n. 2000-31**. Seoul, Korea, 2000.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Mol Aspects Med**, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, Apr-Jun 2006.

KUTYAVIN, I. V. et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 2, p. 655-661, Jan 15 2000.

LACERDA, J. T.; CARVALHO, R. A. Descrição e manejo integrado da mosca-branca (*Bemisia spp.*) transmissora de *geminivirus* em culturas econômicas. *Tecnol. & Ciên. Agropec.*, João Pessoa, v.2., n.2, p.15-22, jun. 2008.

LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; MENEZES, E. W. Qualidade nutricional. In: *Cultura do feijoeiro comum no Brasil*. Piracicaba: Potafos, P. 23-97, 1996.

LAUBE, I. et al. Development of primer and probe sets for the detection of plant species in honey. **Food Chemistry**, v. 118, n. 4, p. 979-986, Feb 15 2010.

LEE, S.-H. Screening DNA chip and event-specific multiplex PCR detection methods for biotech crops. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 14, p. 2856-2862, Nov 2014.

LEE, S.-H.; KIM, S.-J.; YI, B.-Y. Simplex and Duplex Event-Specific Analytical Methods for Functional Biotech Maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7178-7185, Aug 26 2009.

LI, X. et al. Establishment and Application of Event-Specific Polymerase Chain Reaction Methods for Two Genetically Modified Soybean Events, A2704-12 and A5547-127. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 24, p. 13188-13194, Dec 2011.

LIPP, M. et al. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. **Journal of Aoac International**, v. 88, n. 1, p. 136-155, Jan-Feb 2005.

MA, H. et al. High-throughput, low-cost, and event-specific polymerase chain reaction detection of herbicide tolerance in genetically modified soybean A2704-12. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 1, p. 696-703, 2014 2014.

MANO, J. et al. Development and Validation of Event-Specific Quantitative PCR Method for Genetically Modified Maize MIR604. **Food Hygiene and Safety Science**, v. 53, n. 4, p. 166-171, Aug 2012.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Perfil do feijão no Brasil. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>. Acesso em 26/11/14.

MARIA LOPEZ-CALLEJA, I. et al. Development of a real time PCR assay for detection of allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 480-490, Apr 2013.

MENG, Y. et al. Applicability of Plasmid Calibrant pTC1507 in Quantification of TC1507 Maize: An Interlaboratory Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 23-28, Jan 11 2012.

MERCATI, F. et al. Genetic diversity and population structure of a common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) collection from Calabria (Italy). **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 60, n. 3, p. 839-852, Mar 2013.

MEYER, R. Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. **Food Control**, v. 10, n. 6, p. 391-399, Dec 1999.

MIRAGLIA, M. et al. Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 7, p. 1157-1180, Jul 2004.

MOKHTARI, W. et al. Real-time PCR using SYBR Green for the detection of *Shigella* spp. in food and stool samples. **Molecular and Cellular Probes**, v. 27, n. 1, p. 53-59, Feb 2013.

NICKLAS, J. A.; BUEL, E. Quantification of DNA in forensic samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 8, p. 1160-1167, Aug 2003.

NOGUCHI, A. et al. Inter laboratory Validation Study of an Event-Specific Real-time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified 55-1 Papaya. **Journal of AOAC International**, v. 96, n. 5, p. 1054-1058, Sep-Oct 2013.

OLEXOVA, L.; DOVICOVICOVA, L.; KUCHTA, T. Comparison of three types of methods for the isolation of DNA from flours, biscuits and instant paps. **European Food Research and Technology**, v. 218, n. 4, p. 390-393, Mar 2004.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Departamento de economia rural. Feijão: análise da conjuntura agropecuária, 2013. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/file/deral/prognosticos/feijao_2013_14.pdf, acesso em: 20/11/14.

QUINTELA, E. D. Manual de identificação dos insetos e invertebrados: pragas do feijoeiro. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002.

RANDHAWA, G. J.; SHARMA, R.; SINGH, M. Qualitative and Event-Specific Real-Time PCR Detection Methods for Bt Brinjal Event EE-1. **Journal of AOAC International**, v. 95, n. 6, p. 1733-1739, Nov-Dec 2012.

RONNING, S. B. et al. Event specific real-time quantitative PCR for genetically modified Bt11 maize (*Zea mays*). **European Food Research and Technology**, v. 216, n. 4, p. 347-354, Apr 2003.

ROSSEN, L. et al. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 37-45, 9// 1992.

RUTLEDGE, R. G.; COTÉ, C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. Nucleic Acid Research, v. 31, n. 16, 2003.

SCHMIDT, M. A.; PARROTT, W. A. Quantitative detection of transgenes in soybean *Glycine max* (L.) Merrill and peanut (*Arachis hypogaea* L.) by real-time polymerase chain reaction. **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 5, p. 422-428, Jul 2001.

SCHNEEBERGER, C. et al. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. **PCR Methods Appl**, v. 4, n. 4, p. 234-8, Feb 1995.

SCHOLTENS, I. et al. Practical Experiences with an Extended Screening Strategy for Genetically Modified Organisms (GMOs) in Real-Life Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 38, p. 9097-9109, Sep 25 2013.

SCHOLTENS, I. M. J. et al. Increased efficacy for in-house validation of real-time PCR GMO detection methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 6, p. 2213-2227, Mar 2010.

SHIN, K.-S. et al. Event-specific Qualitative and Quantitative Polymerase Chain Reaction Methods for Detection of Insect-resistant Genetically Modified Chinese Cabbage Based on the 3'-junction of the Insertion Site. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 367-375, Jun 2012.

SINGH, S. P. Broadening the genetic base of common bean cultivars: A review. **Crop Science**, v. 41, n. 6, p. 1659-1675, Nov-Dec 2001.

SOMMA, M. Session 4: Extraction and Purification of DNA.: In: The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically

Modified Organisms. User manual. **Joint Research Centre**, Ispra 2006.

SOMMA, M.; QUERCI, M. SESSION 6. The polymerase chain reaction (PCR). In: The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. User manual. Joint Research Centre, ISPRA, 2006.

SPIEGELHALTER, F.; LAUTER, F. R.; RUSSELL, J. M. Detection of genetically modified food products in a commercial laboratory. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 5, p. 634-640, Jun-Jul 2001.

SVETLEVA, D.; VELCHEVA, M.; BHOWMIK, G. Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) improvement. **Euphytica**, v. 131, n. 2, p. 189-200, 2003 2003.

TAKABATAKE, R. et al. Establishment and Evaluation of Event-Specific Quantitative PCR Method for Genetically Modified Soybean MON89788. **Food Hygiene and Safety Science**, v. 51, n. 5, p. 242-246, Oct 2010.

VANELLA, R. et al. Development of an event-specific assay for the qualitative and quantitative detection of the genetically modified flax CDC Triffid (FP967). **Food Control**, v. 41, p. 128-133, Jul 2014.

VENTURELLI, G. L. et al. A Specific Endogenous Reference for Genetically Modified Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) DNA Quantification by Real-Time PCR Targeting Lectin Gene. **Molecular Biotechnology**, v. 56, n. 11, p. 1060-1068, Nov 2014.

VILHORDO, B. W. ET AL. Morfologia. In: Cultura do feijoeiro comum no brasil. Piracicaba: Potafos, P. 71-73, 1996.

VOLLENHOFER, S. et al. Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 5038-5043, Dec 1999.

WAIBLINGER, H.-U.; GROHMANN, L. Guidelines for validation of DNA extraction methods applied in subsequent PCR analysis of food and feed products for the presence of genetically modified material.

**Journal Fur Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit-
Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 9, n. 2, p. 183-190, Jun 2014.

WANG, W.-X. et al. Event-specific qualitative and quantitative detection of transgenic rice Kefeng-8 by characterization of the transgene flanking sequence. **European Food Research and Technology**, v. 234, n. 3, p. 477-484, Mar 2012.

WEIGHARDT, F. **Session 10. Quantitative PCR for the detection og GMOs: In: The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms**. User manual. Ispra, **Joint Research Centre**, 2006.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3741-3751, Oct 1997.

WOLF, C. et al. Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results. **European Food Research and Technology**, v. 210, n. 5, p. 367-372, 2000 2000.

WU, G. et al. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of genetically modified rapeseed Topas 19/2. **Food Chemistry**, v. 112, n. 1, p. 232-238, Jan 2009.

WU, Y. et al. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection methods for Transgenic rapeseed hybrids MS1 x RF1 and MS1 x RF2. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8380-8389, Oct 17 2007.

_____. Collaborative Validation of an Event-Specific Quantitative Real-Time PCR Method for Genetically Modified Rice Event TT51-1 Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 25, p. 5953-5960, Jun 26 2013.

WURZ, A. et al. Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. **Food Control**, v. 10, n. 6, p. 385-389, Dec 1999.

XU, J. et al. Flanking sequence determination and event-specific detection of genetically modified wheat B73-6-1. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 45, n. 5, p. 416-421, May 2013.

XU, W. T. et al. Establishment and evaluation of event-specific qualitative and quantitative PCR method for genetically modified soybean DP-356043-5. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 4, p. 685-695, Oct 2011.

YANG, C.; ZHANG, D.; YANG, L. Development of event-specific PCR detection methods for genetically modified tomato Huafan No. 1. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 3, p. 652-660, Feb 2013.

YANG, L. et al. Event-specific quantitative detection of nine genetically modified maizes using one novel standard reference molecule. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 15-24, Jan 10 2007.

YE, J. et al. Melting curve SNP (McSNP) genotyping: a useful approach for diallelic genotyping in forensic science. **Journal of Forensic Sciences**, v. 47, n. 3, p. 593-600, May 2002.

YONEKURA-SAKAKIBARA, K.; SAITO, K. Review: genetically modified plants for the promotion of human health. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 24, p. 1983-1991, Dec 2006.

ZEL, J. et al. Method Validation and Quality Management in the Flexible Scope of Accreditation: An Example of Laboratories Testing for Genetically Modified Organisms. **Food Analytical Methods**, v. 1, n. 2, p. 61-72, Jun 2008.

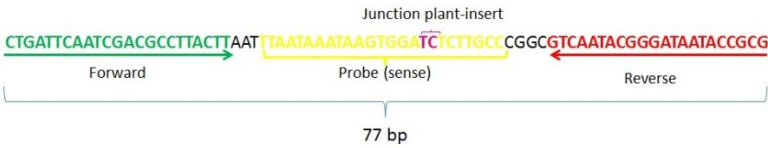
ZHANG, L.; HUANG, X.; ZHU, S. An event-specific real-time PCR detection system for the transgenic rice line 114-7-2 of producing functional human serum albumin. **European Food Research and Technology**, v. 239, n. 3, p. 403-408, Sep 2014.

ZHANG, M. et al. Event-specific detection of genetically modified wheat B73-6-1 based on the 3'-flanking sequence. **European Food Research and Technology**, v. 235, n. 6, p. 1149-1159, Dec 2012.

ZHANG, N. et al. Event-specific qualitative and quantitative PCR detection of LY038 maize in mixed samples. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1287-1295, Aug 2011.

ZIMMERMANN, M. J.; TEIXEIRA, M. G. Origem e evolução. In: Cultura do feijoeiro comum no brasil. Piracicaba: Potafos, P 57-68, 1996.

APÊNDICE A - BORDER JUNCTION SEQUENCE OF EMBRAPA 5.1 EVENT SHOWING AMPLIFIED FRAGMENT USING BEANF/ VECTORR R PRIMER PAIR AND FGM PROBE



**APÊNDICE B - SPECIFICITY TEST OF SYBR GREEN ASSAY USING DIFFERENT BEAN/VECTOR
PRIMER PAIR CONCENTRATIONS.**

[primer] (nM)	400		300		200		100	
Template DNA ^a	Cq	Tm	Cq	Tm	Cq	Tm	Cq	Tm
Positive samples								
Embrapa 5.1 GM Pérola	19.46	73.95	19.3	74.14	19.55	73.95	20.51	73.57
	18.68	73.76	19.46	74.14	19.47	73.95	20.64	73.57
Embrapa 5.1 GM Pontal	19.69	73.76	19.46	73.76	19.69	73.76	20.72	73.38
	19.96	73.57	19.95	73.57	19.97	73.57	20.98	73.19
Negative samples								
Embrapa 2.3 GM common bean	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	-	-
	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	-	-
	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	-	-
	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	-	-
Pérola common bean	nd	nd	nd	Nd	35.02	74.14	nd	nd
	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd
	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	-	-
	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	-	-
	-	-	-	-	nd	nd	-	-
	-	-	-	-	32.49	74.56	-	-
Pontal common bean	35.32	73.95	nd	Nd	nd	nd	nd	nd
	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd
	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	-	-
	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	-	-
	-	-	-	-	nd	nd	-	-
	-	-	-	-	nd	nd	-	-

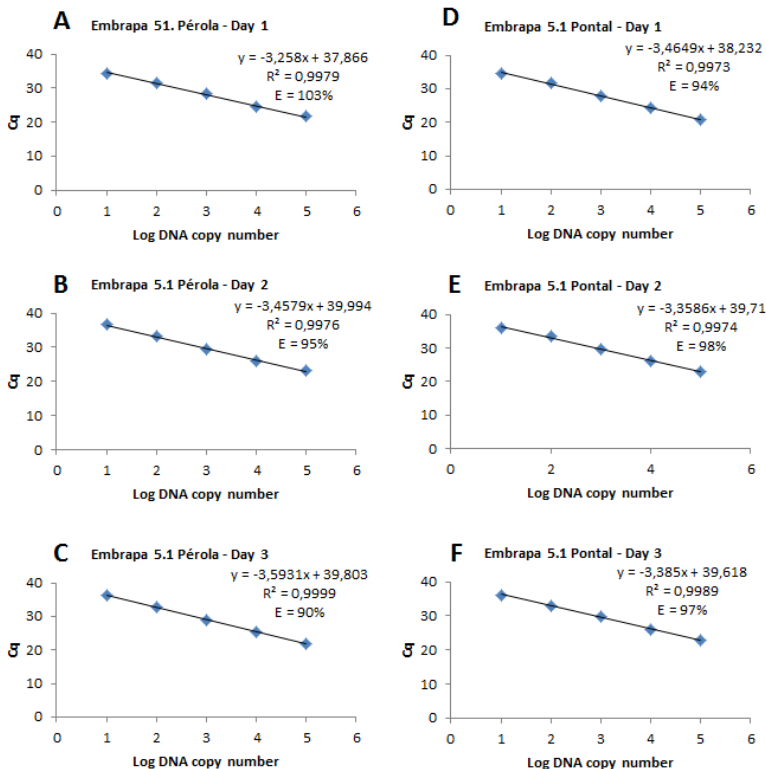
(Continuação) SPECIFICITY TEST OF SYBR GREEN ASSAY USING DIFFERENT BEANF/VECTORR
PRIMER PAIR CONCENTRATIONS.

[primer] (nM)	400		300		200		100	
Template DNA ^a	Cq	Tm	Cq	Tm	Cq	Tm	Cq	Tm
Pea	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd
	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd
Soybean	nd	nd	nd	Nd	nd	nd	nd	nd
	35.86	73.95	nd	Nd	nd	nd	nd	nd
Soybean RR	35.00	74.17	35.23	74.36	33.15	73.99	nd	nd
	nd	nd	nd	Nd	35.41	74.17	33.14	74.36
Maize Bt 11	nd	nd	36.98	73.62	nd	nd	33.45	73.81
	33.77	73.81	nd	Nd	34.84	73.62	33.60	73.81
Maize Bt 176	32.97	73.81	35.73	73.44	35.06	73.44	33.78	73.99
	34.64	73.62	34.87	73.62	35.43	73.26	33.59	73.99
Maize MON 810	35.18	73.62	35.03	73.99	34.18	73.99	33.49	74.36
	33.11	73.44	nd	Nd	nd	nd	31.75	74.36

nd: not detected

- : not performed

**APÊNDICE C - TAQMAN FGM ASSAY STANDARD CURVES
OBTAINED IN 3 qPCR RUNS USING THREE DNA EXTRACTS
FROM EACH GM VARIETY. EACH PCR RUN WERE
PERFORMED IN A DIFFERENT DAY.**



(A) extract A of Embrapa 5.1 GM Pérola – day 1; (B) extract B of Embrapa 5.1 GM Pérola – day 2; (C) extract C of Embrapa 5.1 GM Pérola – day 3. (D) extract A of Embrapa 5.1 GM Pontal – day 1; (E) extract B of Embrapa 5.1 GM Pontal – day 2; (F) extract C of Embrapa 5.1 GM Pontal – day 3.